



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

TESIS DOCTORAL

**BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES Y ESTUDIO
DE MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS EN LA
ENFERMEDAD DE POMPE**

Doctoranda:

Ana Carrasco Rozas

Directores:

Dr. Jorge Alberto Díaz Manera

Dr. Eduard Gallardo Vigo

Tutor:

Dr. Luis Antonio Querol Gutiérrez



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Programa de Doctorado en Medicina
Departamento de Medicina
Barcelona, 2022

A mi familia,

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral es el resultado del trabajo de cinco largos e intensos años al lado de personas que la han hecho posible y a las que me gustaría dedicarles unas palabras de agradecimiento.

A la Dra. Isabel Illa, gracias por haberme dado la oportunidad de entrar en el grupo de Neuromuscular, por haber permitido que realice mi tesis doctoral y haberla tutorizado durante tanto tiempo.

Gracias a mis directores, Edu y Jordi, por haber confiado en mí desde el principio, por toda vuestra dedicación, por transmitirme vuestros conocimientos y, sobre todo, por vuestro optimismo cuando la ciencia nos daba la espalda. Otra vez, gracias porque sin vosotros no habría podido escribir ni una de las palabras plasmadas en esta tesis.

Gracias a todos los compañeros del servicio de Neuromuscular, a los que estaban hace ya ocho años y a los que han ido apareciendo con el tiempo, por haber compartido todo vuestro conocimiento. Gracias a Montse, Luis, Edu, Jordi, Janina, Elena, Ricard, Alicia, Ana Siles, Fina, Noemí, Rodrigo, Jorge, David, Luis, Xavi, Patri, Esther, Cinta, Sonia, Lorena, Elba y Marta.

Gracias a Luis, por haber asumido los últimos meses de tutorización de esta tesis. Aunque haya sido de manera *express*, hay muchos de tus conocimientos reflejados aquí.

Gracias a Noemí y a Xavi, porque no pude tener mejores profesores y mentores cuando llegué a hacer mis prácticas. Trabajar con vosotros mano a mano ha sido un auténtico lujo. Además, gracias a Xavi por seguir confiando en mí día a día, nunca conseguiré tener un jefe mejor.

Gracias a Cinta y a Esther por haber sido mi soporte y mi guía. Gracias por las risas y los llantos, por haber sido las que más me habéis aguantado día a día. A pesar de que la

vida nos vaya separando, siempre seremos el mejor trío científico de compis y amigas. Gracias a Elba, Lorena, Marta y de nuevo Cinta y Esther. Trabajar entre amigas ha sido, sin duda, lo mejor que me llevo de esta tesis. Que sigamos compartiendo momentos, sobre todo conociendo mundo juntas.

Gracias a Patri, Rodrigo, Jorge, Sonia y una vez más a Xavi, Elba, Lorena, Marta, Cinta y Esther, por las bodas, las cervezas/vinos, y las risas. Por haber creado un ambiente de trabajo donde las horas pasan volando, tanto dentro del labo como fuera.

Gracias a mis *Nenis*, por estar siempre ahí, para lo bueno y sobre todo para lo malo. Sois un apoyo fundamental en mi vida y saber que os tengo de manera infinita no me puede hacer más feliz. Gracias también a mis *Caritas*, por estar dispuestas siempre a una quedada para desconectar y aguantar mis penas, por las múltiples casas rurales y las conversaciones que nunca acabaría. Gracias a Judit e Irene, mis *Biomédicas sexys*, por iniciaros conmigo en el mundo de la Ciencia. Gracias a mis *Topikis*, por estar siempre en todas vuestras versiones. Gracias a todos los nombrados y a los que me dejo.

Gracias en especial a mi familia. A mis padres, Francisco y Loli, por ser un ejemplo a seguir tanto de manera independiente como unidos. Cuando os miro, veo el claro ejemplo de lo que quiero ser en el futuro. Gracias también a todos mis hermanos: Samuel, María, Isabel, Raquel, Lucía y Clara, porque habéis hecho que valiese la pena no tener habitación propia, los turnos en el lavabo, heredar ropa, lo viajes en manada... porque ser una familia de tantos... ¡mola! Gracias por estar siempre que lo necesito y por darme personitas vitales para mí: Mariona, Inés, Carlota y todos los que llegarán. Una mención especial a María, gracias y muchas veces gracias... por ser mi casi gema y mi persona favorita en el mundo, por estar incondicionalmente a mi lado. Gracias también a los *agregados* porque os habéis convertido en nuevos hermanos para mí. A toda la familia, muchas gracias. ¡Os quiero!

Gracias, especialmente a Alejandro, por estar siempre a mi lado y porque, como te digo siempre, no sé qué sería de mi vida sin ti. Por una vida juntos con todo lo bueno y lo malo que nos depare. Gracias también a Montse y Ángel, por ser unos segundos padres para mí.

Por último, gracias sobre todo a los pacientes, porque ellos son los que permiten que la investigación siga su curso, por todas esas muestras de sangre, tejido y, sobre todo, células.

ABREVIATURAS

$\Delta\Psi_m$:	Potencial de membrana mitocondrial
-p:	Fosforilado
6MWT:	Prueba de marcha de 6 minutos
ALT:	Alanina transaminasa
AMPK:	Proteína quinasa activada por AMP
AST:	Aspartato transaminasa
ASEM:	Federación Española de Enfermedades Neuromusculares
ATP:	Trifosfato de adenosina
bFGF:	Factor básico de crecimiento de fibroblastos
BNIP3:	Proteína 3 que interactúa con Bcl-2
Ca⁺⁺:	Calcio
CCND1:	Ciclina D1
cDNA:	DNA complementario
CK:	Creatinquinasa
CS:	Células satélite
CVF:	Capacidad vital forzada
DE:	Desviación estándar
DM:	Dermatomiositis

DMD:	Distrofia muscular de Duchenne
DMEM:	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
EGF:	Factor de crecimiento epidérmico
EMA:	Agencia Europea del Medicamento
EMG:	Electromiografía
ENM:	Enfermedad Neuromuscular
EP:	Enfermedad de Pompe
EPI:	Enfermedad de Pompe Infantil
EPIT:	Enfermedad de Pompe de Inicio Tardío
FAP:	Progenitores fibro/adipogénicos
FBS:	Suero fetal bovino
FbxO32:	<i>F-Box Protein 32 (Atrogin-1)</i>
FGF-6:	Factor de crecimiento fibroblástico 6
FoxO3:	<i>Forkhead Box O3</i>
FST:	Folistatina
FUNDC1:	Proteína 1 que contiene el dominio FUN14

GAA:	α -1,4-glucosidasa ácida	M6P:	Manosa-6-Fosfato
GFP:	Proteína fluorescente verde	ME:	Músculo esquelético
Glc4:	Glucosa tetrasacárida	MEC:	Matriz extracelular
HDAC4:	Histona deacetilasa 4	MFM-20:	Escala funcional motora
HE:	Hematoxilina-Eosina	MFR:	Factor regulador miogénico
HGF:	Factor de crecimiento Hepático	miRNA:	microRNA
HIF-1α:	Factor 1 inducible por hipoxia	MM:	Miopatías metabólicas
IF:	Inmunofluorescencia	MPR:	Receptor de manosa-6-fosfato
IGF-1:	Factor de crecimiento Insulínico de tipo 1	MRC:	<i>Medical Research Council</i>
IHQ:	Inmunohistoquímica	mRNA:	RNA mensajero
IL-1β:	Interleuquina-1 β	mTORC1/mTOR:	Complejo diana de la rapamicina 1
IL-4:	Interleuquina-4	MuRF-1:	<i>Muscle RING-finger protein-1</i>
IL-10:	Interleuquina-10	Myf5:	Factor miogénico 5
INF-γ:	Interferón- γ	MyHC/MYH1:	Marcador de la cadena pesada de miosina
kb:	Kilobases	MyoD:	Factor de diferenciación miogénica
LAMP:	Proteína asociada a membrana lisosomal	MYOG:	Miogenina
LC3:	Proteína asociado a la cadena ligera de microtúbulos 3	NeoGAA:	Avalglucosidasa α
LDH:	Lactato deshidrogenasa	NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
LGMD:	Distrofia muscular de cinturas	nt:	Nucleótidos
MAPK:	Proteínas quinasa activadas por mitógenos	PAS:	Periodic Acid-Schiff
		pb:	Pares de bases

PE:	Fosfatidiletanolamina	TRIM63:	<i>Tripartite Motif Containing 63</i> (MuRF-1)
PDGF:	Factor de crecimiento derivado de plaqueta	TUNEL:	<i>TdT-UTP nick-end labeling</i>
PI3K:	Fosfatidilinositol-3-quinasa	ULK1:	Quinasa 1 activadora de autofagia como Unc-51
Pre-miRNA:	Precursor del miRNA	UTR:	Regiones no traducidas
Pri-mRNA:	Precursor primario del miRNA	UTRN:	Utrofina
rAAV:	Vectores de adenovirus asociados recombinantes	VEGF:	Factor de crecimiento endotelial vascular
rhGAA:	α -glucosidasa humana recombinante	WB:	Western Blot
RISC:	Complejo de silenciamiento inducido por RNA		
RNA:	Ácido ribonucleico		
RNAasa:	Ribonucleasa		
RM:	Resonancia magnética		
ROI:	Regiones de interés		
ROS:	Especies reactivas de oxígeno		
RT-PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real		
SDS:	<i>Sequence Detection System</i>		
SQDTM1:	Secuestrosoma 1 (= p62)		
SRF:	Factor de respuesta al suero		
TGF-β:	Factor de crecimiento transformante β		
TNF-α:	Factor de necrosis tumoral α		
TRE:	Terapia de reemplazo enzimático		

RESUMEN.....	13
ABSTRACT.....	15
1. INTRODUCCIÓN.....	17
1.1. MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	19
1.1.1. ESTRUCTURA.....	19
1.1.2. CONTRACCIÓN MUSCULAR.....	22
1.1.3. TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES.....	22
1.1.4. REGENERACIÓN MUSCULAR.....	23
1.1.4.1. Papel de la inflamación en la degeneración y regeneración muscular.....	24
1.1.4.2. Papel de las células satélite en la regeneración muscular.....	27
1.1.4.2.1. Factores reguladores miogénicos.....	28
1.1.4.2.2. Vías de señalización.....	29
1.1.4.2.3. Factores de crecimiento.....	30
1.1.4.3. Remodelación y maduración muscular.....	31
1.2. ENFERMEDADES NEUROMUSCULARES.....	33
1.2.1. MIOPATÍAS METABÓLICAS.....	33
1.3. ENFERMEDAD DE POMPE.....	34
1.3.1. DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD.....	34
1.3.2. EPIDEMIOLOGÍA.....	35
1.3.3. FISIOPATOLOGÍA.....	35
1.3.3.1. Autofagia.....	37
1.3.3.1.1. Mitofagia.....	40
1.3.3.2. Lipofuscinosis.....	41
1.3.4. CLASIFICACIÓN Y SINTOMATOLOGÍA.....	41
1.3.5. GENÉTICA.....	44
1.3.6. DIAGNÓSTICO.....	45
1.3.6.1. Análisis clínicos.....	45
1.3.6.1.1. Electromiografía.....	45
1.3.6.1.2. Estudios de espirometría.....	47
1.3.6.1.3. Pruebas funcionales.....	47

1.3.6.1.4. Resonancia magnética	47
1.3.6.2. Análisis en laboratorio	48
1.3.6.2.1. Analítica de sangre	48
1.3.6.2.2. Biopsia muscular.....	48
1.3.6.2.3. Actividad enzimática de GAA.....	49
1.3.6.2.4. Genética	49
1.3.6.2.5. Glucosa tetrasacárida en orina	49
1.3.7. TRATAMIENTO.....	50
1.3.7.1. Terapia de reemplazo enzimático.....	50
1.3.7.2. Estrategias terapéuticas en desarrollo	51
1.4. BIOMARCADORES	53
1.4.1. miRNAs.....	53
1.4.2. miRNAs EN MÚSCULO ESQUELÉTICO: DYSTROMIRs.....	55
1.4.2.1. miR-133a y miR-133b.....	56
1.4.2.2. miR-1 y miR-206	58
<u>2. HIPÓTESIS</u>	<u>61</u>
<u>3. OBJETIVOS</u>	<u>65</u>
<u>4. MATERIAL Y MÉTODOS.....</u>	<u>69</u>
4.1. PACIENTES	71
4.1.1. MUESTRAS BIOLÓGICAS: SUERO Y BIOPSIA MUSCULAR	73
4.1.2. IMAGEN MUSCULAR.....	73
4.1.3. PRUEBAS DE FUNCIÓN MUSCULAR	74
4.2. BIOLOGÍA MOLECULAR	74
4.2.1. CUANTIFICACIÓN DE MIRNAS POR PCR EN TIEMPO REAL	74
4.2.1.1. miRNAs en suero	74
4.2.1.1.1. Fase de descubrimiento	75
4.2.1.1.2. Fase de validación.....	75
4.2.1.2. miRNAs en músculo.....	76
4.2.2. CUANTIFICACIÓN DE MRNA POR PCR EN TIEMPO REAL	77

4.2.2.1. Expresión génica en músculo	77
4.2.2.2. Expresión génica en miotubos	78
4.3. ENSAYOS IN VITRO	78
4.3.1. CULTIVOS PRIMARIOS HUMANOS DE BIOPSIA MUSCULAR.....	78
4.3.2. CULTIVO Y TRANSFECCIÓN DE MIOBLASTOS INMORTALIZADOS	79
4.4. WESTERN BLOT.....	80
4.5. HISTOLOGÍA, INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOFLUORESCENCIA	82
4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	85
4.6.1. FASE DE DESCUBRIMIENTO DEL ESTUDIO DE MIRNAS.....	85
4.6.2. FASE DE VALIDACIÓN DEL ESTUDIO DE MIRNAS	86
4.6.3. CORRELACIONES CLÍNICAS	86
4.6.4. ESTUDIO DE MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DE LA EP	86
<u>5. RESULTADOS</u>	<u>89</u>
5.1. IDENTIFICACIÓN DE MIRNAS EN PACIENTES CON EP.....	91
5.1.1. DESCRIPCIÓN DE LA COHORTE DE PACIENTES	91
5.1.2. EXPRESIÓN DE MIRNAS EN SUERO	92
5.1.3. EXPRESIÓN DE MIRNAS EN MÚSCULO	95
5.1.4. CORRELACIÓN ENTRE LAS PRUEBAS CLÍNICAS Y LA EXPRESIÓN DE MIRNAS EN SUERO	96
5.2. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE ATROFIA MUSCULAR EN LA EP.....	98
5.2.1. DESCRIPCIÓN DE LA COHORTE DE PACIENTES	98
5.2.2. CORRELACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DE VACUOLAS Y EL TAMAÑO DE LAS FIBRAS MUSCULARES.....	98
5.2.3. ESTUDIO DE LOS MARCADORES DE ATROFIA EN EL MÚSCULO DE PACIENTES	101
5.2.3.1. Expresión de BNIP3 y otros marcadores de atrofia.....	101
5.2.3.2. Estudio de las vías de regulación de BNIP3.....	105
5.2.3.3. Estudio de las funciones principales de BNIP3.....	108
5.2.4. ESTUDIOS DE ATROFIA MUSCULAR EN MIOTUBOS DE PACIENTES	110
5.2.4.1. Estudios de proliferación y diferenciación	111
5.2.4.2. Estudios de atrofia en miotubos de pacientes con EPIT	112
5.2.4.3. Efectos en la formación de miotubos derivados de la transfección de BNIP3 en mioblastos inmortalizados.....	115

<u>6.</u>	<u>DISCUSIÓN.....</u>	<u>117</u>
<u>7.</u>	<u>CONCLUSIONES</u>	<u>131</u>
<u>8.</u>	<u>LÍNEAS DE FUTURO</u>	<u>135</u>
<u>9.</u>	<u>BIBLIOGRAFÍA.....</u>	<u>139</u>
<u>10.</u>	<u>ANEXO.....</u>	<u>159</u>
10.1.	ANEXO 1	161
10.2.	ANEXO 2	172

RESUMEN

La enfermedad de Pompe de inicio tardío (EPIT) es un trastorno genético raro producido por mutaciones en el gen *GAA* y se caracteriza por una debilidad muscular progresiva. Las biopsias musculares de pacientes con EPIT muestran una acumulación de glucógeno que se asocia a la presencia de vacuolas autofágicas induciendo en fases avanzadas una atrofia de las fibras musculares.

Esta tesis doctoral se centra en dos investigaciones principales. Por un lado, se realizó un estudio sobre los niveles de miRNAs en suero de pacientes con EPIT con el fin de encontrar posibles biomarcadores de la progresión de la enfermedad. Por otro lado, se estudiaron diferentes mecanismos fisiopatológicos en los pacientes con EPIT, centrándose en el proceso de atrofia muscular.

En el primer estudio, identificamos 14 miRNAs que mostraron diferentes niveles de expresión en muestras de suero de pacientes con EPIT en comparación con los controles. Validamos estos resultados en una cohorte más grande de pacientes y encontramos niveles elevados de 3 miRNAs, los llamados dystromiRs: miR-1-3p, miR-133a-3p y miR-206. Estos miRNAs están involucrados en la regeneración muscular y la expresión de éstos se encontró incrementada en biopsias musculares de pacientes con EPIT. Se encontraron correlaciones significativas entre los niveles de miRNAs y la prueba de función muscular.

En conclusión, los niveles de expresión sérica de dystromiRs pueden representar biomarcadores potenciales para el seguimiento de pacientes con EPIT.

En el segundo estudio, se realizó el análisis de la expresión de moléculas relacionadas con la atrofia de fibras musculares en biopsias de pacientes con EPIT mediante técnicas de inmunotinción y RT-PCR. BNIP3, un atrogén bien conocido, se identificó como un mediador potencial de la atrofia en pacientes con EPIT. Observamos que las fibras

vacuoladas en biopsias musculares de pacientes con EPIT eran más pequeñas que las fibras no vacuoladas y que, además, expresaban BNIP3.

Nuestros datos sugieren que la expresión de BNIP3 está regulada por la inhibición de la vía AKT-mTOR, lo que lleva a la fosforilación de ULK1 en Ser317 por AMPK. Estudiamos mioblastos y miotubos obtenidos de pacientes con EPIT y controles para confirmar estos resultados utilizando diferentes técnicas moleculares. Los miotubos derivados de pacientes con EPIT también eran más pequeños y expresaban BNIP3. Adicionalmente, la transfección de BNIP3 en miotubos de control condujo a la atrofia de los miotubos.

En conclusión, todos estos hallazgos sugieren una cascada que comienza con la inhibición de la vía AKT-mTOR y la activación de la expresión de BNIP3 que, a su vez, conduce a la atrofia de las fibras musculares. Nuestros resultados abren la puerta a nuevos tratamientos potenciales dirigidos a BNIP3 para reducir sus efectos nocivos sobre la atrofia de las fibras musculares en la enfermedad de Pompe.

ABSTRACT

Late-onset Pompe disease (LOPD) is a rare genetic disorder produced by mutations in the *GAA* gene and is characterized by progressive muscle weakness. LOPD muscle biopsies show a progressive accumulation of glycogen and autophagic vacuoles eventually leading to the atrophy of muscle fibers.

This doctoral thesis focuses on two main investigations. A first set of experiments was performed with the aim to identify miRNAs in the serum of LOPD patients that could be biomarkers of the disease progression. A second group of experiments was performed to study the different pathophysiological mechanisms of the disease leading to muscle atrophy.

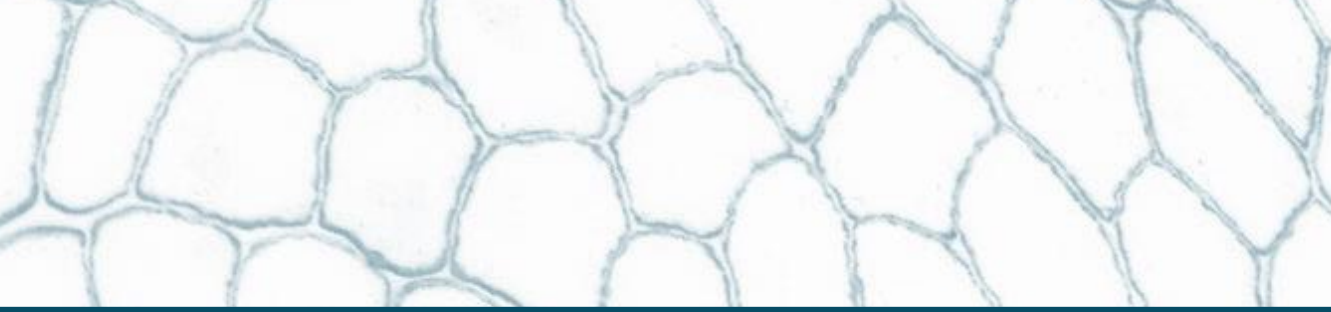
In the first study, we identified 14 miRNAs that showed different expression levels in serum samples of LOPD patients compared to controls. We validated these results in a larger cohort of patients and we found increased levels of 3 miRNAs, the so-called dystromiRs: miR-1-3p, miR-133a-3p and miR-206. These miRNAs are involved in muscle regeneration and the expression was increased in muscle biopsies from patients. Significant correlations between miRNA levels and muscle function tests were found.

In conclusion, serum expression levels of dystromiRs may represent potential biomarkers for the follow-up of LOPD patients.

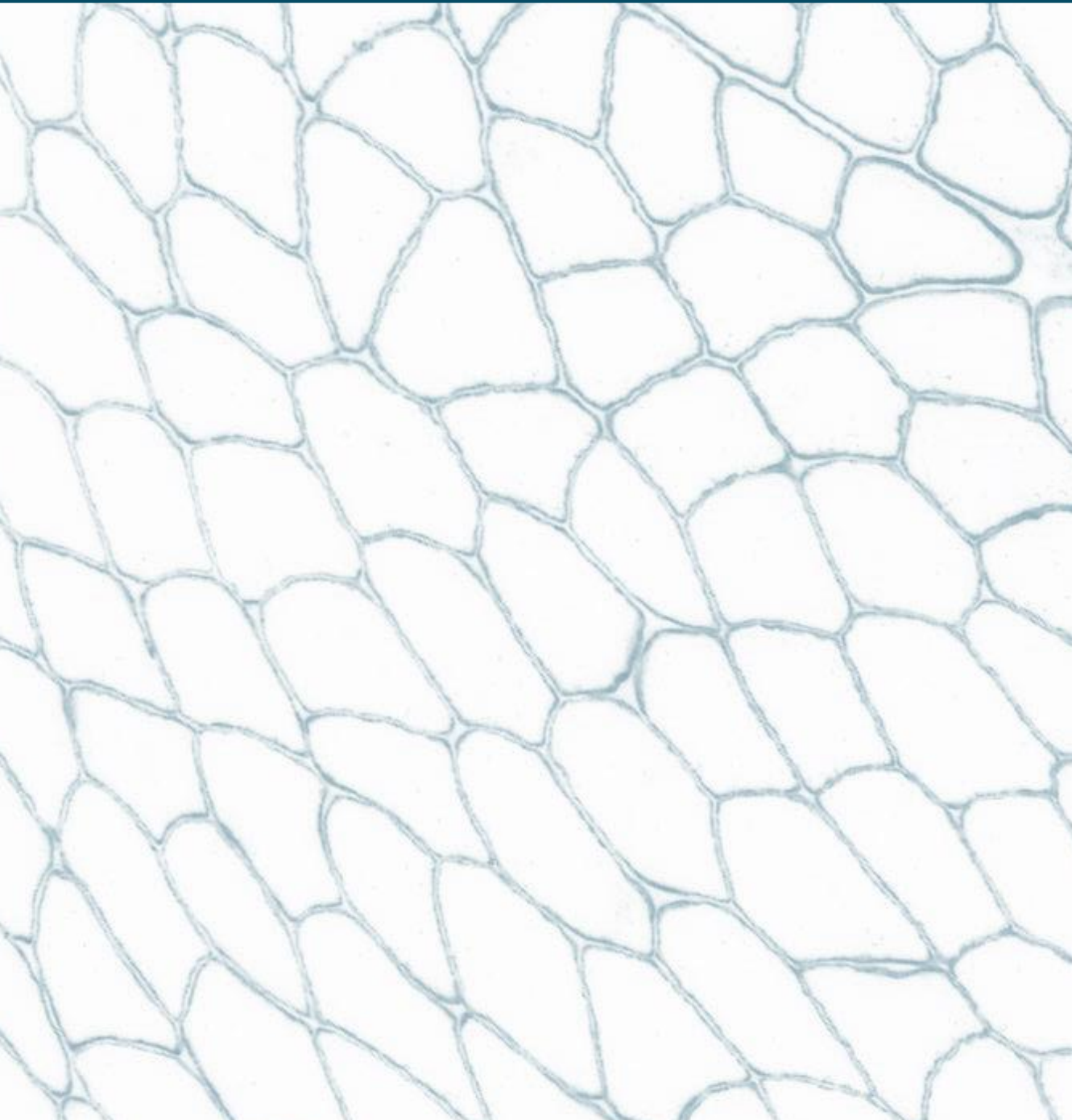
In the second study, the expression of molecules related to muscle fiber atrophy in muscle biopsies of LOPD patients was analyzed using immunostaining techniques and RT-PCR. BNIP3, a well-known atrogene, was identified as a potential mediator of muscle fiber atrophy in LOPD muscle biopsies. We observed that vacuolated fibers in LOPD patients' muscle biopsies were smaller than non-vacuolated fibers and expressed BNIP3.

Our data suggested that BNIP3 expression is regulated by inhibition of the AKT-mTOR pathway, leading to phosphorylation of ULK1 at Ser317 by AMPK. We studied myoblasts and myotubes obtained from LOPD patients and controls to confirm these results using different molecular techniques. Myotubes derived from LOPD patients were likewise smaller and expressed BNIP3. Conclusively, transfection of BNIP3 into control myotubes leads to myotube atrophy.

In conclusion, all these findings suggest a cascade which starts with the inhibition of the AKT-mTOR pathway and activation of BNIP3 expression leading to progressive muscle fiber atrophy. Our results open the door to potential new treatments targeting BNIP3 to reduce its deleterious effects on muscle fiber atrophy in Pompe disease.



1. INTRODUCCIÓN



La introducción de la presente tesis se centra en describir la enfermedad de Pompe (EP) y el músculo esquelético (ME), tejido principalmente afectado en la enfermedad. Además, otro capítulo está focalizado en describir los microRNAs (miRNAs) como biomarcadores, centrándonos en la implicación de éstos en el ME.

1.1. Músculo esquelético

El **ME** es uno de los tejidos más dinámicos del cuerpo humano. Contiene entre el 50 y el 75% de todas las proteínas corporales y representa entre el 30 y el 50% del recambio de proteínas del organismo. Está compuesto principalmente de agua (75%), proteínas (20%) y otras sustancias, incluidas sales inorgánicas, minerales, grasas y carbohidratos (5%). El ME está conectado al esqueleto para formar parte del sistema mecánico que mueve las extremidades y otras partes del cuerpo.^(1,2)

1.1.1. Estructura

La organización macroscópica de los músculos está formada por nervios, vasos sanguíneos, tejido conectivo y tejido contráctil.

La **fibra muscular**, o miocito, se forma a partir de células musculares mononucleares conocidas como mioblastos que se fusionan entre sí formando esta estructura con múltiples núcleos. La fibra muscular se encuentra rodeada por una red de tejido conectivo conocida como **endomisio**. Las fibras adyacentes también se agrupan entre ellas, formando estructuras denominadas fascículos, y son rodeadas por un tejido conectivo más robusto conocido como **perimisio**. Varios fascículos están cubiertos por una gruesa capa de tejido conectivo llamado **epimisio**, formando así el ME (**Figura 1**). Cada una de estas redes de tejido conectivo está compuesta por proteínas de la matriz extracelular (MEC), entre las que se incluye el colágeno.^(3,4)

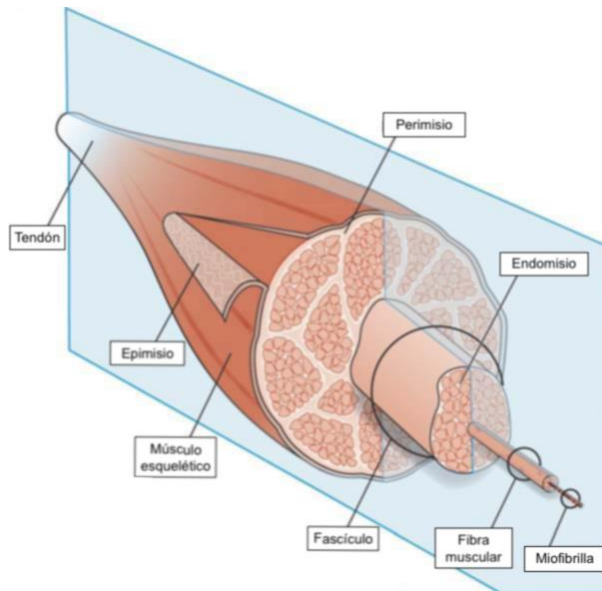


Figura 1: Organización general del tejido muscular. Modificación de Gillies AR et al.⁽³⁾

Las fibras musculares varían en tamaño, entre 10 y 120 μm , y están rodeadas por una membrana plasmática denominada **sarcolema**, que a su vez están rodeadas por la **lámina basal**. Dichas estructuras contienen una serie de proteínas que conectan moléculas del citoesqueleto del interior de las fibras con la MEC. Cada fibra muscular está compuesta por múltiples **miofibrillas** que proporcionan al músculo la capacidad de contracción y plasticidad. El citoplasma, donde éstas están contenidas, se denomina **sarcoplasma**, y en él podemos localizar un retículo endoplasmático liso que rodea las miofibrillas conocido como **retículo sarcoplásmico**, el cual presenta unas invaginaciones denominadas túbulos T. Éste desempeña un papel de reservorio de Calcio (Ca^{++}), clave en el proceso de contracción muscular.

Las **miofibrillas** están compuestas por una serie de subunidades, los **sarcómeros**, formados por filamentos gruesos (miosina) y filamentos delgados (actina), que se conectan a otras proteínas musculares para construir las unidades contráctiles. Estos filamentos están dispuestos de forma muy organizada dando un aspecto estriado con unas bandas oscuras (bandas A) y otras claras (bandas I). Las **bandas A** son las

regiones donde los filamentos gruesos y delgados se localizan juntos, y muestran una región media más clara conocida como **banda H**, donde los filamentos delgados están ausentes. Las **bandas I** contienen filamentos exclusivamente delgados y están divididas por una línea más oscura conocida como el **disco Z**, donde los filamentos delgados de sarcómeros consecutivos se unen. El sarcómero viene delimitado por dos de estos discos (**Figura 2**).⁽³⁻⁶⁾

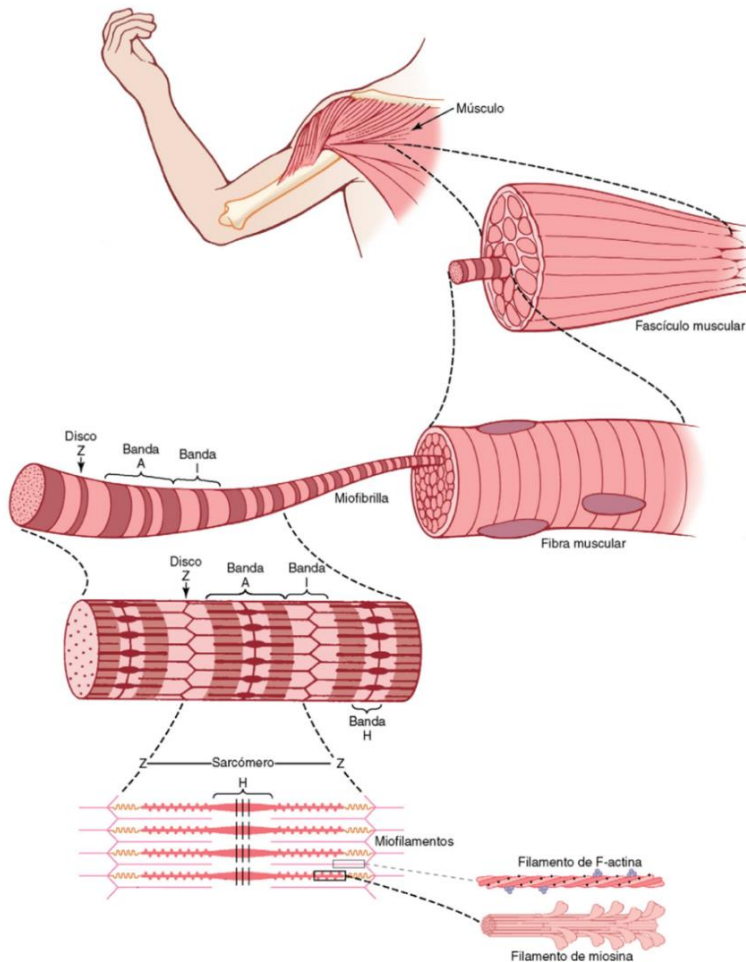


Figura 2: Organización del músculo esquelético desde el nivel macroscópico al nivel molecular.

Modificación de Guyten&Hall⁽⁶⁾.

1.1.2. Contracción muscular

El sarcómero y el sarcoplasma contienen muchas otras proteínas que contribuyen a la estructura del citoesqueleto, los procesos de excitación y contracción, la liberación de energía y la generación de fuerza y potencia.⁽⁷⁾

La **contracción muscular** se inicia por la producción de un potencial de acción que viaja desde la neurona motora a través de la unión neuromuscular. En dicha estructura, la liberación del neurotransmisor de acetilcolina conduce el potencial de acción hacia la fibra muscular donde la despolarización provoca que el retículo sarcoplásmico libere grandes cantidades de iones de Ca^{++} . El Ca^{++} provoca fuerzas de atracción entre los filamentos de actina y miosina, haciendo que se deslicen unos sobre otros en sentido longitudinal promoviendo el proceso de contracción. Este proceso requiere un **alto consumo de energía** en forma de trifosfato de adenosina (**ATP**) que es hidrolizado gracias a la actividad ATPasa presente en la cabeza de miosina.

La principal **f fuente de ATP** es la **fosfocreatina** cuya hidrólisis libera energía en forma de fosfato que se une al ADP para formar ATP. Una segunda fuente de energía es el **glucógeno** almacenado en el músculo.^(1,5-7)

1.1.3. Tipos de fibras musculares

En la cabeza de la miosina se localiza la cadena pesada, cuyas isoformas determinan la velocidad a la que se contrae el músculo, así como sus propiedades fisiológicas. Dependiendo de estas isoformas podemos encontrar los siguientes grupos:^(2,6,8-10)

- **Fibras tipo I o lentas:** son pequeñas fibras rojizas que contienen grandes cantidades de mitocondrias y una gran vascularización por su metabolismo oxidativo. Además, contienen altos niveles de mioglobina que se combina con el oxígeno y lo almacena para su transporte hacia las mitocondrias. Estas fibras se contraen lentamente por la baja actividad de la ATPasa de la miosina.

- **Fibras tipo II o rápidas:** son fibras grandes con un retículo sarcoplásmico extenso y mayor liberación de iones de Ca^{++} para obtener una mayor fuerza de contracción. Estas fibras se dividen en dos subgrupos:
 - o **Fibras tipo IIa:** son fibras que contienen una gran cantidad de mitocondrias y de mioglobina para llevar a cabo su metabolismo oxidativo. Se les caracteriza por presentar cantidades elevadas de glucógeno y por llevar a cabo una glucólisis anaeróbica.
 - o **Fibras tipo IIb:** son grandes fibras blanquecinas que presentan un metabolismo principalmente glucolítico, almacenando glucógeno en ellas. Son capaces de presentar contracciones rápidas e intensas, aunque se agotan fácilmente debido a la producción de ácido láctico.

1.1.4. Regeneración muscular

El ME tiene una gran capacidad de regenerar nuevas fibras musculares en respuesta a un daño,^(11,12) por el resultado de una enfermedad, la exposición a diferentes agentes miotóxicos, un trauma o, incluso, la contracción de nuestro propio músculo.

La reparación del ME es un proceso altamente coordinado donde se encuentran involucradas la activación de respuestas celulares y moleculares, en el cual la sincronización entre inflamación y regeneración es crucial para que el ME se repare exitosamente después del daño muscular. La reparación muscular completa consta de dos fases fundamentales: degeneración y regeneración.^(13,14) Éstas las podemos encontrar divididas en cinco pasos: **degeneración** (necrosis), **inflamación**, **regeneración**, **remodelación** y **maduración**. La cinética y la amplitud de cada fase dependen particularmente del tipo de daño.⁽¹⁵⁾

En la **Figura 3** podemos observar el estado del ME en una biopsia muscular durante el proceso de degeneración/regeneración muscular después del daño, en este caso con cardiotoxina. Dos días después de la lesión, la estructura de la fibra muscular está

severamente deteriorada y presenta una multitud de células mononucleares (mioblastos, células inflamatorias, fibroblastos, etc.) en el área dañada. A los cinco días de la lesión, además de seguir presentando células mononucleares en la biopsia, también se forman pequeñas nuevas fibras con núcleos centrales. Dos meses después de la lesión, la arquitectura muscular es similar a la del músculo sano sin lesionar.⁽¹⁶⁾

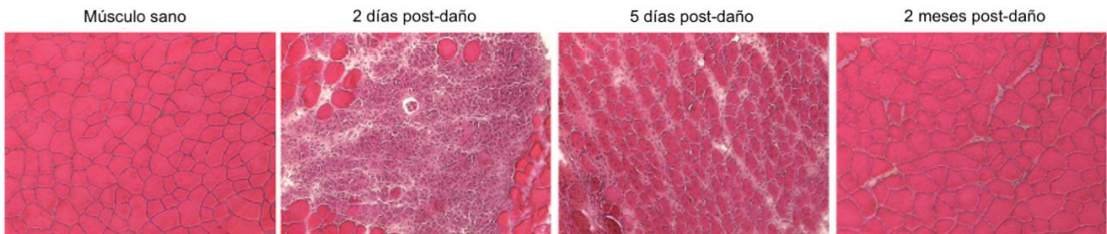


Figura 3. Regeneración del músculo esquelético. Tinciones Hematoxilina-Eosina (H&E) que ilustran las diferentes etapas de la regeneración muscular después de una lesión por cardiotoxina. Modificación de Dumont NA et al⁽¹⁶⁾.

1.1.4.1. *Papel de la inflamación en la degeneración y regeneración muscular*

El proceso de degeneración se caracteriza por una **necrosis** e inflamación significativa. Con el daño, se altera la integridad del sarcolema lo que induce a un aumento de la permeabilidad de las fibras provocando que se eleven las concentraciones séricas de proteínas musculares, como la creatinquinasa (CK). También se eleva la entrada de Ca^{++} provocando la activación de la proteólisis dependiente de éste e iniciando la degeneración de las fibras musculares.⁽¹⁷⁾

Inmediatamente empieza la fase de **inflamación** en la zona de la lesión, donde intervienen diferentes poblaciones celulares del sistema inmunológico que interactúan entre ellas mediante la secreción de diferentes moléculas (**Figura 4**).

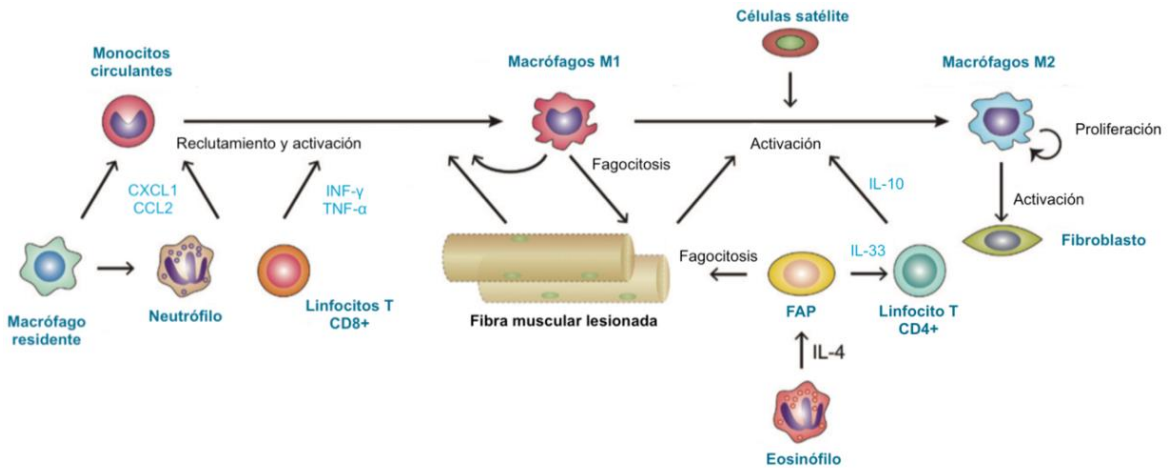


Figura 4. Interacciones celulares durante la regeneración muscular que coordinan los procesos inflamatorios y de reparación. Modificación de Oishi Y & Manabe I⁽¹⁸⁾.

Las primeras células inflamatorias que van hacia esta zona son los **neutrófilos**, encontrando concentraciones máximas de éstos a las 24h. A las 36-48h de la lesión ya no son detectables, ya que una exposición prolongada de neutrófilos sería contraproducente debido a la secreción de moléculas citotóxicas.⁽¹⁵⁾ Estas células inflamatorias responden a diferentes quimiocinas secretadas por **macrófagos residentes** que se encuentra inactivados en la zona, pero la lesión promueve su activación y liberación de moléculas proinflamatorias. Algunas de estas quimiocinas a las que responden los neutrófilos son CXCL1 y CCL2.⁽¹⁹⁾ Una vez atraídos a la zona de la lesión muscular, los neutrófilos son fagocitos encargados, por un lado, de limpiar los restos tisulares por la secreción de proteasas y, por otro, de estimular la llegada de otras células inflamatorias al tejido lesionado por la secreción de citocinas proinflamatorias. Los monocitos son los siguientes en migrar a la zona dañada donde empiezan a diferenciarse a **macrófagos**, convirtiéndose en la célula inflamatoria predominante en la regeneración muscular.^(18,20,21)

Existen dos subpoblaciones diferentes de macrófagos, los M1 y M2, que presentan funciones opuestas y su transición coincide con la progresión de los procesos de inflamación a regeneración y maduración de las fibras musculares. La primera población de **macrófagos M1**, CD68+/CD163-, llega a la zona 24h después del daño y

tiene su pico máximo a los dos días. Estas células son capaces de liberar moléculas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la interleuquina-1 β (IL-1 β) que tienen la función de promover la fagocitosis de los restos celulares y la proliferación de células satélite (CS). TNF- α conduce a la activación y proliferación tanto de macrófagos M1 como de CS, preparando así al músculo para la posterior diferenciación de estas células a miotubo. La segunda población de **macrófagos M2**, CD68-/CD163+, tiene una función opuesta ya que secreta moléculas antiinflamatorias, como la interleuquina-10 (IL-10) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), que promueven a finalizar el proceso de inflamación y a la diferenciación de las CS, favoreciendo así la fusión y maduración de los miotubos. Además, estas moléculas promueven la transición M1-M2 del resto de macrófagos presentes en el músculo dañado mediante la activación de la vía de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK). Esta última población de macrófagos M2 alcanza su pico máximo sobre los 4 días después de la lesión y se mantiene hasta el final de la regeneración muscular donde el ME entra en fase de remodelación. En esta última fase, los macrófagos M2 tienen un papel muy importante, ya que la secreción de TGF- β activa a los miofibroblastos que llevan a cabo la formación de la MEC.^(18,21-24)

El daño muscular también lleva al reclutamiento rápido de **eosinófilos** que secretan interleuquina 4 (IL-4) activando la proliferación de las **células progenitoras fibro/adipogénicas** (FAP), pudiendo diferenciarse a fibroblastos o adipocitos. La IL-4 promueve la diferenciación a fibroblastos promoviendo la regeneración muscular.^(18,25)

A pesar de que las células mieloides tengan una mayor presencia en el músculo lesionado, los **linfocitos** también juegan un papel en la regeneración muscular. Los linfocitos T CD4+ reguladores (también CD25+/FoxP3+) inducen la proliferación de las CS, y los linfocitos T CD8+ promueven la acumulación y la activación de los macrófagos M1, mediante la secreción de las citocinas proinflamatorias TNF- α e interferón- γ (INF- γ). Además, la acumulación de linfocitos T CD4+ contribuye a la

transición de macrófagos M1 a M2, vía IL-10, que tiene la función de inhibir a las citocinas proinflamatorias.^(18,21)

Una vez acabada la degeneración y eliminación de los restos celulares por las células inflamatorias, se inicia la fase de regeneración muscular.

1.1.4.2. Papel de las células satélite en la regeneración muscular

Este proceso se caracteriza por la activación, proliferación y diferenciación de las CS. Una vez diferenciadas a mioblastos, éstos se fusionan para formar nuevas fibras musculares o reparar las dañadas anteriormente.⁽¹⁵⁾

Las **CS** fueron descritas por Alexander Mauro que encontró células uninucleadas situadas entre el sarcolema y la lámina basal de las fibras musculares.⁽²⁶⁾ Las CS están presentes en el músculo sano del adulto como células inactivas, también llamadas **CS quiescentes**, y representan entre el 2.5% y el 6% de todos los núcleos de una fibra muscular.^(12,27,28) Las CS entran en estado de quiescencia después del crecimiento postnatal, pero pueden activarse en respuesta al **daño del tejido muscular**.⁽²⁹⁾ Después de la lesión, se liberan factores de crecimiento que son captados por moléculas de la lámina basal pudiendo interactuar con las CS para estimular su **activación**.⁽¹⁶⁾

Las CS son las células progenitoras del linaje muscular y, por ello, su función principal es la de regenerar el ME cuando éste es dañado. Una vez activadas, las CS proliferan dando lugar a dos tipos celulares diferentes; por un lado, las células que seguirán proliferando y diferenciarán a mioblasto, llegando a fusionar con la fibra muscular y, por otro, células que dejarán de proliferar y volverán a un estado quiescente cuya misión es mantener el pool de CS musculares.

Existen diferentes **factores reguladores miogénicos** (MFRs) específicos para cada estado de las células durante este proceso de regeneración de fibras musculares.

1.1.4.2.1. Factores reguladores miogénicos

En el músculo de los adultos, el factor de transcripción **Pax7** es el principal factor miogénico de las CS, expresado de manera ubicua en todas ellas. La expresión de Pax7 es esencial para generar y mantener la reserva de CS quiescentes.⁽³⁰⁾

Como ya hemos comentado, una vez las CS son activadas se producen divisiones asimétricas, creando dos tipos de subpoblaciones, diferenciándose entre ellas por la expresión o no del factor miogénico 5 (**Myf5**). Las Myf5⁻, se vuelven quiescentes manteniendo el grupo progenitor y, por otra parte, las Myf5⁺ proliferan y diferencian a mioblastos.⁽³¹⁾ Estas últimas, además de Myf5 y Pax7, empezarán a expresar el factor de diferenciación miogénica (**MyoD**).⁽³²⁾ Este factor tiene un papel fundamental en los mioblastos facilitando la transición de la proliferación a la diferenciación a través de la inducción de inhibidores del ciclo celular, como p21 y p57, y de la inducción de la expresión de miogenina (MYOG).⁽³³⁾ Cuando los mioblastos salen del ciclo celular, entran en un estado de diferenciación convirtiéndose en miocitos, los cuales expresan MYOG y el factor miogénico 4 (MRF4) junto con MyoD. La expresión de **MYOG** se da en el inicio de la formación de miotubos siendo el factor clave que conduce a la fusión de mioblastos. El incremento de la expresión de MYOG se correlaciona con la disminución de la expresión de MyoD, llevando a la formación de miotubos por un proceso de fusión. Finalmente, **MRF4** participa en la maduración de los miotubos, permitiendo la reorganización de los miofilamentos y la migración de los núcleos centrales a la periferia de la célula.⁽³⁴⁾ Los miotubos expresan MYOG, MRF4 y el marcador de la cadena pesada de la miosina (MyHC).^(16,35) La expresión de todos estos factores y las células que los expresan se puede observar en la **Figura 5**.

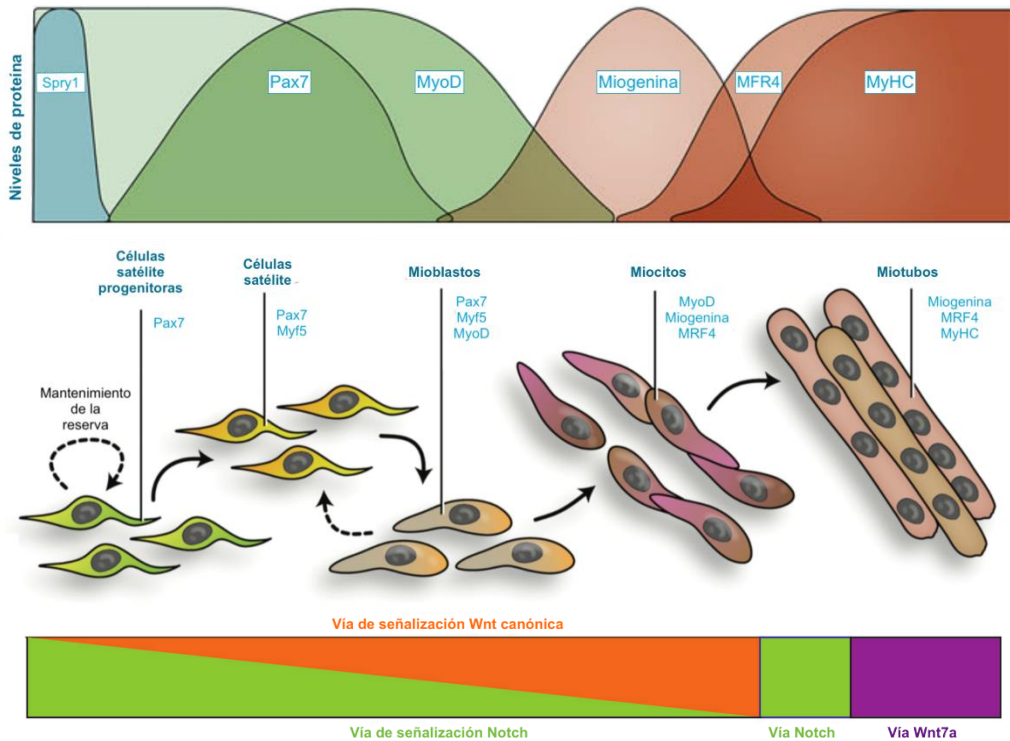


Figura 5. Progresión del linaje miogénico, marcadores expresados en las células y vías de señalización implicadas. Modificación de Dumont NA et al.⁽¹⁶⁾, Morgan J & Partridge T⁽³⁵⁾ y Schmidt M et al⁽³⁶⁾.

1.1.4.2.2. Vías de señalización

Múltiples vías de señalización coordinan la regeneración del ME y las diferentes fases de proliferación, diferenciación y fusión de las CS. Entre éstas se encuentran la vía de Notch y la vía de Wnt, de las cuales un balance entre estas dos vías de señalización es fundamental para una regeneración muscular exitosa (**Figura 5**).

La **vía de señalización Notch** es esencial en las fases iniciales ya que su activación estimula la proliferación de las CS. Esto provoca, por un lado, el mantenimiento de las CS quiescente y, por otro, la estimulación de la población de los mioblastos.^(37,38) En un estado normal, los ligandos de Notch se encuentran secuestrados en la superficie de

las fibras musculares y cuando se produce un daño en el músculo éstos quedan expuestos uniéndose al receptor de Notch de las CS quiescentes provocando una activación de la vía. En este momento, las células reciben un estímulo para entrar en el ciclo celular y, así, empezar a dividirse tanto de manera simétrica como asimétrica. Conforme va aumentando el número de células, la vía se va inhibiendo al mismo tiempo que se va activando la vía de Wnt, promoviendo la diferenciación. No obstante, más adelante, la vía Notch vuelve a activarse ejerciendo un papel fundamental en la inactivación de todas las CS restantes, volviéndolas quiescentes, además de interactuar con moléculas de adhesión en la fase de remodelación de las fibras musculares.⁽³⁶⁾

La **vía de señalización Wnt** presenta dos tipos de rutas principales, la canónica y la no canónica, teniendo ambas un papel fundamental en la regeneración muscular. La no canónica, también denominada **Wnt7a**, tiene un papel fundamental en las fases finales de maduración de las fibras musculares.

La **vía canónica de Wnt** es la que se activa conforme se va inactivando la señalización de Notch. Promueve la transcripción de diferentes genes, entre los que encontramos los MRFs. MyoD y MYOG se encuentran sobreexpresados por la estimulación de esta vía, lo que provoca que los mioblastos entren en estado de diferenciación a miocitos y se fusionen formando las fibras musculares.⁽³⁶⁻⁴⁰⁾

1.1.4.2.3. Factores de crecimiento

En el proceso de regeneración muscular, el ME recibe múltiples señales, entre las que encontramos implicados diversos factores de crecimiento. Entre ellos se encuentran TGF- β , el factor de crecimiento hepático (HGF), el factor de crecimiento fibroblástico 6 (FGF-6), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento insulínico de tipo 1 (IGF-1) y muchos otros.⁽¹³⁾

El **TGF- β** pertenece a una familia de proteínas, incluida la miostatina, que tienen un papel fundamental en la regulación de la proliferación y diferenciación de los

mioblastos, disminuyendo estos procesos y favoreciendo el proceso de cicatrización de las fibras musculares ya que activa el proceso de fibrosis (*véase punto 1.1.4.3*).^(34,41)

El **FGF-6** induce la activación de las CS por su unión al receptor FGFR1 activando la vía de señalización Ras-ERK. Por otro lado, FGF-6 activa la diferenciación induciendo la expresión de MYOG y MyoD, vía receptor FGFR4.^(37,42)

El **PDGF** es producido por plaquetas, células endoteliales, células musculares y macrófagos, de manera que actúan en los fibroblastos induciendo su proliferación, diferenciación y producción de MEC.⁽⁴³⁾

El **HGF** es secretado por la MEC después de la lesión, promoviendo la migración de las CS hacia la zona dañada. Además, induce la entrada del ciclo celular a las CS quiescentes favoreciendo su proliferación, vía activación de p38, MAPK y PI3K.^(34,37,44)

El **IGF-1** contribuye inicialmente en la activación y proliferación de las CS por la activación de la vía Ras-ERK estimulando marcadores de progresión del ciclo celular, como Ciclina D. Finalmente, IGF-1 estimula la diferenciación induciendo la expresión de factores como MyoD, MYOG y p21, mediante la activación de la vía PI3K-Akt. Además, este factor promueve la supervivencia celular durante la diferenciación por la activación de vías antiapoptóticas de la familia de Bcl-2.^(13,37,45)

1.1.4.3. Remodelación y maduración muscular

La **remodelación de la MEC** se produce por la secreción de múltiples moléculas, como colágenos, fibronectina, elastina, proteoglicanos y laminina, que generan una estructura de soporte para que las fibras musculares que se acaban de formar se asienten.^(3,15)

Como se ha comentado anteriormente, TGF- β , secretado por los macrófagos M2, es un factor de crecimiento profibrótico con un papel fundamental en la formación de la MEC. Así mismo, TGF- β actúa como un factor antiapoptótico de miofibroblastos,

participa en la proliferación de fibroblastos y en la diferenciación de éstos a miofibroblastos, los cuales actuarán para promover la producción de las moléculas de la MEC.^(18,46,47) Esta respuesta fibrótica inicialmente es beneficiosa ya que es rápida y da soporte a las fibras musculares protegiendo el lugar de la lesión. Sin embargo, la sobreproducción de colágenos dentro del área lesionada a menudo provoca cicatrices intensas impidiendo una función contráctil muscular normal. Esta fibrosis incrementada se puede observar en muchas distrofias musculares.⁽¹⁵⁾

Finalmente, para que las fibras musculares regeneradas acaben de crecer y madurar, y se recupere la función contráctil completa, es necesario que se lleve a cabo una remodelación de la vascularización y la inervación.^(15,48) La nueva red de capilares en la zona de la lesión se desarrolla a partir de los capilares periféricos que han sobrevivido a la degeneración, **angiogénesis**, o bien por la creación de nuevos capilares, **neovascularización**. Esta nueva red se forma en dirección al centro de la zona dañada, dándole a las fibras el aporte de oxígeno y sustratos necesarios. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) regula este proceso además de promover la proliferación y diferenciación de diversas células, entre ellas las CS.^(49,50) La **inervación** del ME se produce por la reconstrucción de las uniones neuromusculares en las fibras regeneradas que requieren la regeneración de los nervios y de las placas motora ya que intervienen en la alineación, el tipo y el tamaño de las fibras musculares.⁽⁵¹⁾

1.2. Enfermedades Neuromusculares

Las **Enfermedades Neuromusculares** (ENM) son un grupo heterogéneo de más de 150 enfermedades neurológicas, hereditarias o adquiridas, que se caracterizan por poseer afectación en uno de los componentes de la unidad motora: la motoneurona periférica, el nervio, la unión neuromuscular o la fibra muscular.⁽⁵²⁻⁵⁴⁾

Según la Federación Española de Enfermedades Neuromusculares (ASEM) se encuentran dentro del grupo de las denominadas enfermedades raras, ya que no afectan a más de 1 de cada 2,000 personas.⁽⁵⁵⁾

1.2.1. Miopatías metabólicas

Las **miopatías metabólicas** (MM) son un grupo heterogéneo de trastornos genéticos donde el ME es el órgano que está principalmente comprometido junto con otros que pueden estar involucrados, como el hígado y el cerebro. Las MM pueden aparecer a cualquier edad: desde la infancia a la edad adulta.^(56,57) En estos trastornos, el principal mecanismo patogénico de la disfunción muscular es causado por un deterioro bioenergético que puede deberse a defectos de las actividades enzimáticas que regulan los carbohidratos, los lípidos o el metabolismo mitocondrial.^(58,59)

En cuanto a la vía metabólica alterada, podemos diferenciar tres tipos principales de miopatías metabólicas: 1) Glucogenosis musculares 2) Trastornos del metabolismo lipídico y 3) Miopatía mitocondrial.^(53,58,60)

La enfermedad de Pompe, objeto de esta tesis, es un tipo de glucogenosis muscular.

1.3. Enfermedad de Pompe

1.3.1. Descripción de la enfermedad

La **Enfermedad de Pompe** (EP), también conocida como glucogenosis tipo II o deficiencia de maltasa ácida (OMIM ID: 232300), es una miopatía metabólica hereditaria de carácter autosómico recesivo. Está producida por mutaciones en el gen *GAA* que codifica para la enzima lisosomal α -glucosidasa ácida (**GAA**), una hidrolasa ácida cuya función es encargarse de la degradación del glucógeno a glucosa en los lisosomas. La deficiencia total o parcial de la actividad de la enzima *GAA* provoca la acumulación lisosomal y citoplasmática de glucógeno provocando la interrupción de la citoarquitectura y función de los tejidos afectados, principalmente ME, cardíaco y liso (**Figura 6**), lo que conduce a una debilidad muscular progresiva. La EP se considera una enfermedad multisistémica ya que el acúmulo de glucógeno en diferentes tejidos provoca afectación en el sistema nervioso central y periférico, hígado, riñones, huesos y otros.^(61–65)

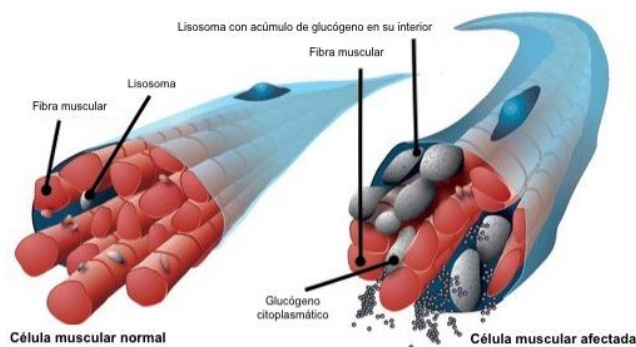


Figura 6. Acumulación lisosomal y citoplasmática de glucógeno en la célula muscular en la EP.

Modificación de Al Jasmi F et al⁽⁶⁵⁾.

El gen *GAA* se encuentra en el brazo largo del cromosoma 17 (17q25.2-q25.3)⁽⁶⁶⁾ y se han identificado más de 500 mutaciones, registradas oficialmente en el *Pompe Center del Erasmus MC de Rotterdam*: (<http://cluster15.erasmusmc.nl/klgn/pompe/mutations.html>).

1.3.2. Epidemiología

La EP es independiente del sexo debido a que es una enfermedad autosómica recesiva. La prevalencia estimada en la EP es aproximadamente de 1:40,000 dependiendo de la etnia y la región geográfica, desde 1:14,000 en la población afro-americana hasta 1:100,000 en individuos de origen europeo.⁽⁶⁷⁾

Algunos estudios realizados en los últimos años indican diferentes prevalencias según las poblaciones de estudio. En Taiwán se ha establecido que ésta es de 1:16,919, en Austria 1:8,684 y en Hungría 1:4,000.⁽⁶⁸⁻⁷¹⁾ No obstante, los últimos estudios epidemiológicos aportan hallazgos inesperados en los cuales se describe una prevalencia mucho más alta de la enfermedad que la previamente reconocida. La estimación es de 1:27,800 (Universidad de Washington), 1:8,657 (Missouri) y 1:15,133 (Illinois) para todas las formas de la enfermedad.⁽⁷²⁾

A pesar de existir dificultades a la hora de establecer un valor concreto de prevalencia en la EP, el portal de información europeo de enfermedades raras (Orphanet) establece que la prevalencia de esta enfermedad es de 1-9:100,000. Además se establece que la incidencia en la EP es de alrededor de 1:57,000 para la forma adulta y de 1:138,000 para la forma infantil.⁽⁶¹⁾

1.3.3. Fisiopatología

El déficit de actividad enzimática de la GAA provoca el acúmulo de glucógeno en el interior de los lisosomas de las fibras musculares (*véase punto 1.3.1*).

Durante muchos años la fisiopatología de la EP se ha explicado por una **ruptura de los lisosomas** y posterior expansión del glucógeno por toda la fibra muscular. Este modelo se argumenta en diferentes etapas explicando así la **progresión** de la enfermedad (**Figura 7**).

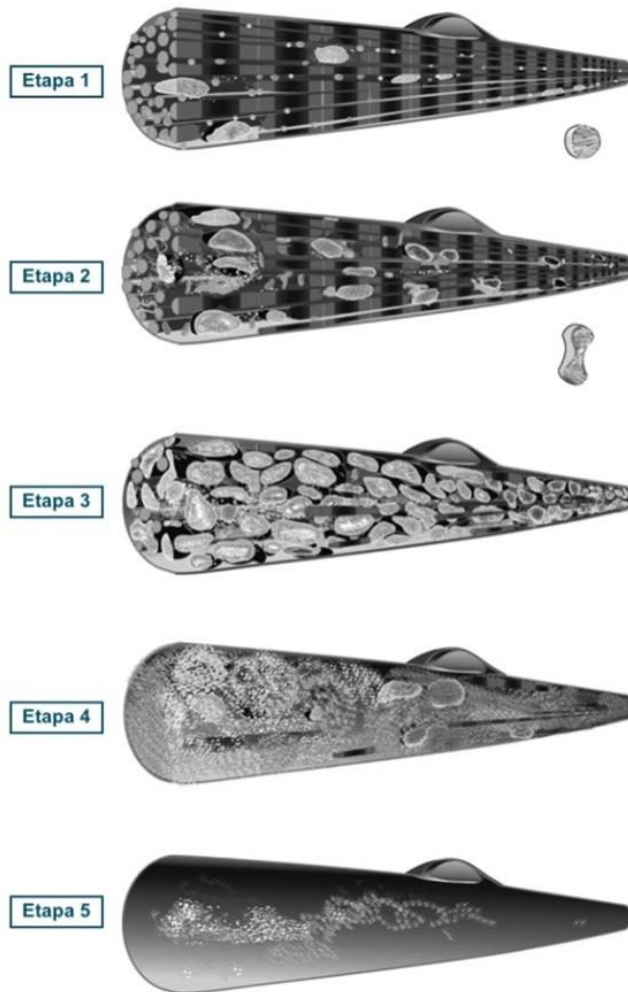


Figura 7. Modificación de Thurberg B et al⁽⁷³⁾.

En etapas tempranas, las fibras musculares contienen en el sarcoplasma pequeños lisosomas cargados de glucógeno entre las miofibrillas. En la etapa 2, a medida que el glucógeno continúa acumulándose, estos lisosomas aumentan de tamaño y número. En algunas áreas, el glucógeno se ha escapado de los lisosomas hacia el sarcoplasma y se evidencia destrucción de las miofibrillas. En la etapa 3, los lisosomas presentan ruptura de membrana, lo que permite un mayor acúmulo de glucógeno en el sarcoplasma. La estructura mitocondrial es anormal y quedan muy pocos fragmentos de miofibrillas. En las etapas finales (4 y 5), la mayor parte del glucógeno es sarcoplásmico y ha reemplazado completamente los elementos contráctiles de la fibra

muscular. Además, se produce una infiltración de agua en el interior de las fibras que provoca una disolución del glucógeno por toda la fibra.⁽⁷³⁾

Durante los últimos años se han puesto de manifiesto diferentes estudios que explicarían **mecanismos fisiopatológicos**, como la autofagia, la homeostasis del calcio, el estrés oxidativo y diferentes anomalías mitocondriales, que contribuyen al daño muscular y a la progresión de la EP.⁽⁷²⁾

1.3.3.1. Autofagia

Una de las responsabilidades principales del lisosoma consiste en la degradación del material intracelular a través de un mecanismo fisiológico llamado **autofagia**.

Se han identificado al menos 3 tipos de autofagia (**Figura 8**). En la **microautofagia** el material intracelular a degradar entra directamente en el lisosoma por invaginación. Por otro lado, en la **autofagia mediada por chaperonas** las proteínas citosólicas son marcadas con un complejo de chaperonas, incluida Hsc70, que conducen a las proteínas hacia el lisosoma y se translocan al interior de éste. Por último, y la más relevante en la EP, en la **macroautofagia** (normalmente llamada simplemente autofagia) el objetivo es proporcionar aminoácidos y energía cuando la célula lo necesita. Cuando el aporte de nutrientes se encuentra restringido, las células son capaces de crear vesículas autofágicas formadas por parte de su propio citoplasma (**autofagosomas**) que descargan su contenido en los lisosomas para su degradación y reciclaje. Además, estas vesículas pueden unirse con endosomas formados por endocitosis y formar los denominados anfisomas que se unirán posteriormente a los lisosomas. El flujo autofágico se completa tras la degradación de la carga lisosomal en los llamados **autolisosomas**. El incumplimiento de cualquiera de estos pasos da como resultado un bloqueo autofágico.^(64,72,74)

Podemos encontrar otros tipos de autofagia selectiva clasificadas según su tipo de sustrato, como por ejemplo la mitofagia, la reticulofagia o la glicofagia, entre otras, en

las que las mitocondrias, el retículo endoplasmático y el glucógeno, respectivamente, son marcados para incorporarse en los autofagosomas para su posterior degradación (véase la mitofagia en el punto 1.3.3.1.1).

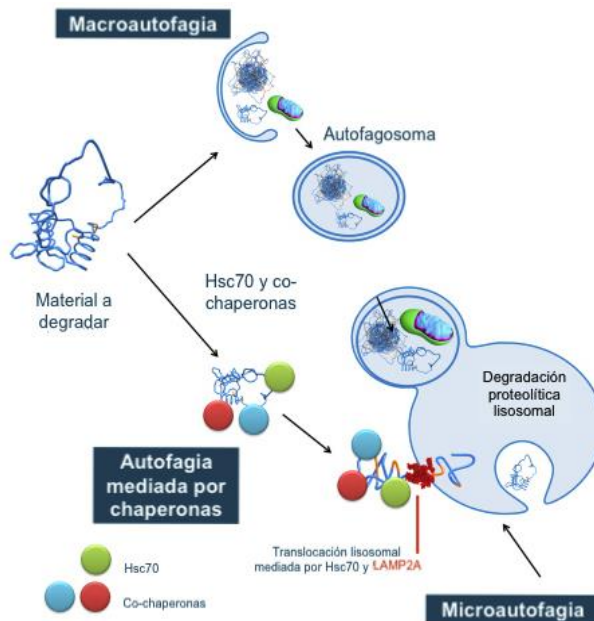


Figura 8. Vías de la autofagia. Modificación de Korovila I et al⁽⁷⁵⁾.

En etapas iniciales de la autofagia (desde ahora este término hace referencia a la macroautofagia), la formación del autofagosoma está mediada por múltiples vías entre las que se encuentran involucrados: el complejo PI3K, el complejo quinasa 1 activadora de autofagia como Unc-51 (ULK1), el complejo mTORC1 y los sistemas ATG12 y ATG8 (**Figura 9**). Además, intervienen múltiples genes y proteínas que regulan todo este proceso, incluidas la proteína asociada a la cadena pesada de microtúbulos 3 (LC3) y p62. **LC3** es una proteína soluble (LC3-I) que rápidamente es conjugada por una fosfatidiletanolamina (PE) a la forma LC3-II. Esta última se localiza en la membrana de los autofagosomas siendo un marcador específico de estas vesículas. **p62**, conocido también como secuestrosoma-1, es una proteína de señalización que juega un papel crítico en la autofagia. Por un lado, se une a la ubiquitina de los sustratos a ser degradados y, por otro lado, se une a LC3-II de la membrana del autofagosoma para

que así éstos puedan ser degradados. Además, p62 será degradado en el autolisosoma jugando el papel de señalizador y de sustrato en la autofagia. Este hecho explica porque el aumento de los niveles de p62 es un indicador de bloqueo de la autofagia.⁽⁷⁶⁻⁷⁸⁾

La vía de señalización más importante en la autofagia está determinada por el complejo diana de la rapamicina 1 (**mTORC1**), el cual en condiciones normales regula negativamente este proceso. **AMPK** induce la autofagia fosforilando y activando **ULK1** o inhibiendo **mTORC1** que a su vez deja de inhibir el complejo **ULK1** y, por lo tanto, se pueden dar las primeras fases de la autofagia. **ULK1** activado fosforila **AGT14** y **Beclin1** para estimular la actividad quinasa de **PI3K** de clase 3, proceso que llevará a la formación del fagóforo y posterior autofagosoma. Además, existen múltiples factores que regulan la activación y/o inhibición del complejo **mTORC1**.

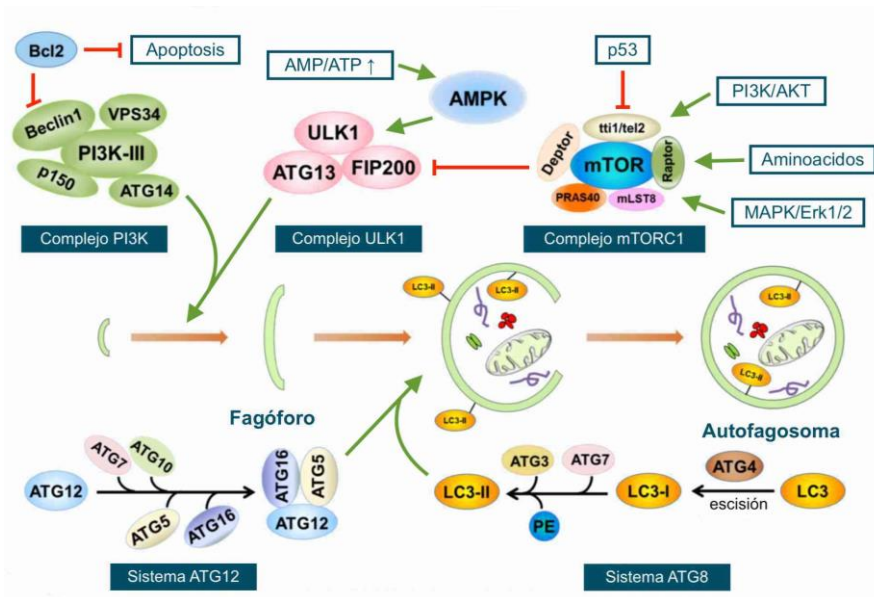


Figura 9. Vías de señalización de la autofagia. Modificación de Li F et al⁽⁷⁸⁾.

Una vez formado el autofagosoma, su fusión con el lisosoma está regulada por diversas proteínas. Los factores de transcripción **TFEB** y **TFE3** juegan un papel

importante en la autofagia, ya que su translocación al núcleo estimula la biogénesis y fusión de autofagosomas y lisosomas. Cuando no se requiere autofagia, mTOR fosforila estos factores de transcripción impidiendo la translocación. Por lo tanto, cuando se inhibe el complejo mTORC1, también lo hace la fosforilación y, por ende, los factores de transcripción pueden ejercer su función.^(74,77,78)

El examen histológico de las biopsias del ME de pacientes con **EP** muestra un **acúmulo de vacuolas autofágicas** en las fibras musculares, lo que sugiere un problema en el flujo autofágico. Mediante inmunohistoquímica (IHQ) en fibras musculares aisladas se ha demostrado una sobreexpresión de los marcadores LC3 y proteína asociada a membrana lisosomal 1 (LAMP1), lo que significa un acúmulo tanto de autofagosomas como de lisosomas, respectivamente. Este hecho indica que la fusión de estas dos vesículas se encuentra interrumpida y como resultado lleva al bloqueo en el proceso de la autofagia, llevando a la formación de grandes **agregados proteicos**. Todo este material depositado en el sarcoplasma de las fibras musculares contribuye al deterioro de la función y la muerte celular del ME de los pacientes con la EP, promoviendo procesos de **atrofia** en el músculo.^(74,79)

En la presente tesis doctoral destacaremos un tipo de autofagia que ha sido objetivo de estudio, la mitofagia.

1.3.3.1.1. *Mitofagia*

La **mitofagia** es el proceso por el que se degradan las mitocondrias por autofagia, ya sea por una renovación basal, por un daño producido o por la necesidad de la célula de obtener nutrientes, es decir, por inanición.

La señalización de la mitofagia se inicia por la activación de la quinasa 1 inducida por PTEN (**PINK1**) provocada por la disminución en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), el cual es fundamental para iniciar el flujo de electrones por la cadena respiratoria para la obtención de ATP. PINK1 es capaz de reclutar Parkina, una

ubiquitina ligasa E3, en la membrana de las mitocondrias promoviendo la ubiquitinación de las proteínas contenidas en la membrana externa mitocondrial. Estas ubiquitinas son fosforiladas por PINK1 y, en este momento, pueden unirse a proteínas adaptadoras del proceso autofágico, como p62, NDP52 y OPTN.

Otra vía de la activación de la mitofagia está **mediada por receptores** de la membrana externa, entre los que encontramos la proteína 3 que interactúa con Bcl-2 (BNIP3) y la proteína 1 que contiene el dominio FUN14 (FUNDC1). Estos receptores al ser activados mediante diferentes estímulos, son capaces de actuar directamente con LC3-II.^(74,80-82)

1.3.3.2. Lipofuscinosis

La **lipofuscina** es un agregado autofluorescente no degradable compuesto de lípidos, carbohidratos y metales, localizado normalmente en los autolisosomas o libre en el citoplasma. El acúmulo de lipofuscina lisosomal promueve el bloqueo autofágico e interfiere en la degradación mitocondrial, lo que lleva a una disminución de la renovación de las mitocondrias viejas o dañadas.

En los últimos años, se ha descrito la presencia de estos agregados en las fibras musculares de pacientes con EP, asociándolos a áreas con acúmulos autofágicos.^(64,74,83)

1.3.4. Clasificación y sintomatología

La EP se clasifica desde el punto de vista clínico en dos grandes grupos claramente diferenciados, con síntomas y progresión diferentes. Existe la forma de presentación infantil y la forma de presentación del adulto. En ambos casos, el acúmulo constante de glucógeno en los tejidos conduce a una debilidad muscular progresiva, asociándose síntomas producidos por disfunción de otros tejidos como el sistema nervioso, y/o el músculo liso y cardíaco. La gravedad varía según la edad de inicio y el grado de

afectación de los órganos. Cada una de las formas de presentación se caracteriza por una actividad de la enzima GAA que determina la gravedad de la EP (**Figura 10**).

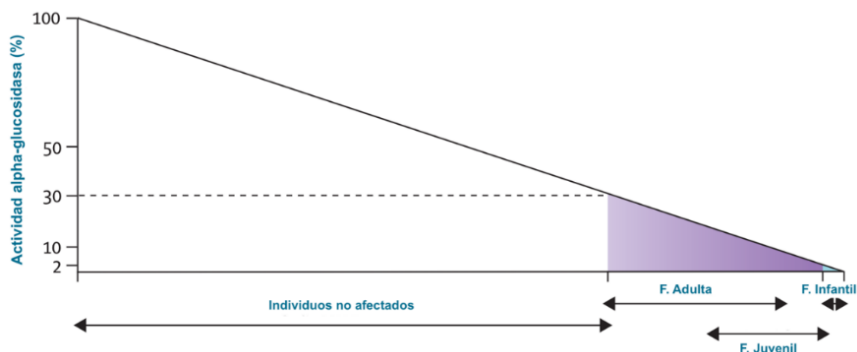


Figura 10. Diferentes formas fenotípicas de la EP según el % de actividad enzimática de la GAA. Modificación de van der Ploeg AT & Reuser AJJ⁽⁶²⁾.

Entre todas las formas de la EP se encuentran dos grupos principales:

- **Enfermedad de Pompe de infantil (EPI):** Esta forma de EP se produce por un déficit inferior al 1% de la actividad enzimática de GAA y la aparición de los síntomas es anterior a los 12 meses de edad.

Dentro de este grupo, predomina la **forma clásica**, descrita por J.C. Pompe en 1930⁽⁸⁴⁾ y caracterizada por una cardiomiopatía hipertrófica rápidamente progresiva, insuficiencia respiratoria, hepatomegalia, debilidad e hipotonía muscular, disfagia y macroglosia. Estos pacientes suelen morir antes del primer año de edad si no se les administra tratamiento por las complicaciones de la cardiomiopatía hipertrófica o de la insuficiencia respiratoria.^(61,85)

También existe una **forma no clásica** con menor gravedad descrita por Hers⁽⁸⁶⁾, que es utilizada para describir a los pacientes que presentan síntomas en el primer año de vida pero sin miocardiopatía y con una esperanza de vida media sin tratamiento de unos 2 años. La causa de muerte en estos casos suele estar relacionada con complicaciones respiratorias secundarias a la debilidad de esta musculatura. La sintomatología de esta forma es similar a la clásica

pero con una debilidad muscular que progresa más lentamente y la cardiomiopatía es menos severa.^(63,72)

- **Enfermedad de Pompe de inicio tardío (EPIT)**: Esta forma de EP se produce por un déficit de entre el 1 al 40% de la actividad enzimática de GAA. Se presenta de dos formas dependiendo de la edad de aparición de los síntomas, la **forma juvenil**, con una aparición entre la infancia y la adolescencia, y la **forma adulta**, cuya aparición es a partir de la segunda década de edad.

La sintomatología de la EPIT abarca un espectro muy heterogéneo caracterizado por una debilidad muscular progresiva con insuficiencia respiratoria. La forma adulta es relativamente lenta, provocando un diagnóstico bastante más tardío, de entre 5 a 10 años después de la aparición de los primeros síntomas. La progresión de la debilidad muscular afecta principalmente a los músculos axiales, de las cinturas y de la musculatura respiratoria, particularmente el diafragma. En estados avanzados de la enfermedad, se establece una profunda debilidad muscular provocando en la mayoría de los casos la dependencia de silla de ruedas. Además, la afectación del diafragma produce una insuficiencia respiratoria con ortopnea, dando lugar a hipoventilación nocturna y a la aparición de apneas del sueño, requiriendo finalmente la ayuda de soporte ventilatorio.

En las últimas décadas, se han descrito otros síntomas en la EPIT, entre los que se incluye: disartria y disfagia, osteoporosis, escoliosis, neuropatía de fibra pequeña, pérdida de audición, función gástrica alterada, afectación del tracto urinario y del esfínter anal, y dolor y fatiga, así como un aumento en la frecuencia de arritmia cardíaca y aneurisma cerebral e intracraneal.^(61-63,66,72,87)

Se conoce como **EP asintomática** aquellos pacientes en los que se realiza el diagnóstico de la enfermedad mediante estudios enzimáticos y/o genéticos, pero no han desarrollado todavía ningún síntoma. En la mayoría de los casos son pacientes que, o bien se han estudiado en el contexto del hallazgo casual de hiperckemia, o bien

son familiares de otros casos diagnosticados. La mayoría de ellos acaba desarrollando síntomas, si bien se han descrito casos de pacientes mayores de 60 años que únicamente presentan hiperckemia y posiblemente sean el espectro más benigno de la enfermedad.⁽⁸⁸⁾ Hoy en día no disponemos de herramientas que nos permitan predecir los pacientes con EPIT que desarrollarán o no síntomas en la evolución de la EP.

En la presente tesis nos centraremos en la EPIT, ya que todos los estudios realizados en nuestro laboratorio son de muestras obtenidas de estos pacientes.

1.3.5. Genética

La EP es una enfermedad hereditaria de **carácter autosómico recesivo** que está causada por una o varias mutaciones en el gen de la GAA. Éste se encuentra en el brazo largo del cromosoma 17 (17q25.2-q25.3). El ácido desoxirribonucleico (DNA) complementario (cDNA) de este gen presenta una longitud de 3.6 kilobases (kb) del cual 2,856 pares de bases (pb) de la secuencia son codificantes. El gen completo, incluyendo los intrones (secuencias no codificantes), tiene una longitud de 28 kb y contiene 20 exones.^(66,89)

En el *Pompe Center del Erasmus MC* de Rotterdam se mantiene un registro actualizado de todas las mutaciones que dan lugar a la EP. Las más frecuentes son mutaciones con cambio de sentido (*missense*), deleciones o mutaciones en el empalme de genes (*splicing*), que se extienden por todo el gen y afectan a algunos de los pasos involucrados en la síntesis, las modificaciones postraduccionales, el tráfico lisosómico o el procesamiento proteolítico de GAA.^(64,90)

La mutación más común es **c.-32-13T> G** (también *IVS1-13T>G*), típica de la EPIT y presente como una de las mutaciones en los individuos heterocigotos. Se trata de una transversión de Timina a Guanina en la posición 13 del intrón 1 del gen, originando un splicing alternativo. Este defecto genera transcritos aberrantes en los que se suprime el

exón 2 además de transcritos completos en el 10% de las veces permitiendo una actividad enzimática de entre un 10-20%.

La mutación **1935C>A** (también *Asp645Glu*) es la más frecuente entre los recién nacidos de Taiwán y China. Adicionalmente, la **delección del exón 18** produce la ausencia de la síntesis de la enzima derivando la forma infantil grave de la EP. En la población de origen africano, la mutación más prevalente es **2560C>T** (también *Arg854X*) en la cual se sintetiza un proteína truncada que se elimina rápidamente.⁽⁶⁴⁾

1.3.6. Diagnóstico

Dada la heterogeneidad clínica en las formas de inicio tardío de la enfermedad y la dificultad del diagnóstico por su semejanza a otras ENM, durante los últimos años se ha aplicado un **diagnóstico diferencial** en el que se aplican diversos algoritmos que incluye diferentes criterios a seguir según los resultados de las pruebas realizadas para, finalmente, llegar al diagnóstico de la EP (**Figura 11**).⁽⁹¹⁾ El carácter progresivo y degenerativo, hace que sea fundamental el diagnóstico precoz de la enfermedad.

Existen múltiples pruebas diagnósticas a realizar en pacientes con sospecha de EP que se describen a continuación.

1.3.6.1. Análisis clínicos

1.3.6.1.1. Electromiografía

Estudios de **electromiografía (EMG)** revelan patrones miopáticos en los músculos proximales del 70% de los pacientes con EPIT. Con esta herramienta se pueden detectar descargas miotónicas, típicamente en musculatura paraespinal, que son altamente sugestivas de la enfermedad, pero no específicas ya que pueden verse en

otras ENM. Se puede observar potenciales de fibrilación y/o signos de denervación.^(61,65)

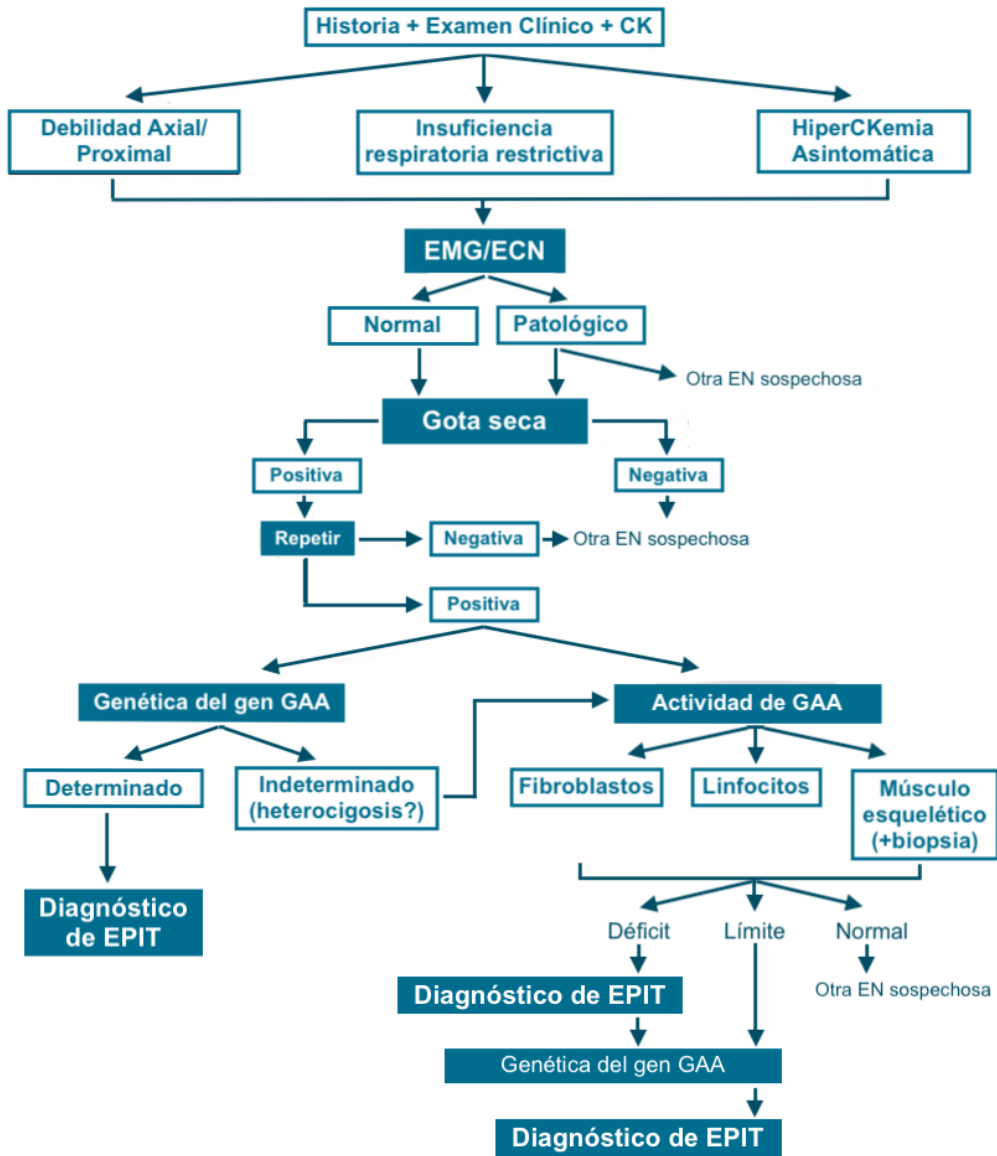


Figura 11. Algoritmo de diagnóstico de EPIT. Modificación de Toscano A et al⁽⁹¹⁾.

1.3.6.1.2. *Estudios de espirometría*

Estos estudios son fundamentales para detectar problemas respiratorios en los pacientes con EPIT. Para ello se analiza la **capacidad vital forzada** (CVF) en posición sentado y, a continuación, acostado. Una disminución de más del 10% entre ambas determina la presencia de debilidad en el diafragma. La musculatura accesoria a éste podría verse también afectada indicándose en pruebas como la medición de la presión inspiratoria y espiratoria. Además, si los pacientes que tienen alteraciones en la CVF sufren fatiga y somnolencia durante el día, se realizan estudios de ventilación nocturna para asegurar que no exista una hipoventilación durante el sueño.^(63,65)

1.3.6.1.3. *Pruebas funcionales*

Se realizan diferentes pruebas para evaluar el estado de los músculos de los pacientes con EPIT, entre las que se encuentran aquellas donde se contabiliza el tiempo que se emplea para realizar una acción: la prueba de marcha de 6 minutos (6MWT) o de 10 min, la prueba de levantarse y andar, la prueba de subir y bajar 4 escalones y el MFM-20 (escala con 20 ítems para medir la función motora). Además, se realizan diferentes estudios para evaluar la fuerza muscular utilizando diferentes escalas como la de MRC (Medical Research Council).

1.3.6.1.4. *Resonancia magnética*

En los últimos años, la **resonancia magnética (RM)** muscular se ha convertido en una herramienta útil en el diagnóstico y seguimiento de la EP. La identificación de los músculos reemplazados por grasa se puede evaluar utilizando secuencias ponderadas T1. No obstante, para el seguimiento detallado son necesarias técnicas más avanzadas como Dixon que es capaz de cuantificar la grasa en un área determinada del ME y, además, ha sido confirmado su efectividad en pacientes con EPIT.⁽⁹²⁻⁹⁴⁾

1.3.6.2. Análisis en laboratorio

1.3.6.2.1. Analítica de sangre

La mayoría de los pacientes con EP presentan **CK** elevadas en el suero hasta 15 veces por encima de los niveles normales. A pesar de ello, la CK es un marcador inespecífico ya que algunos de los pacientes presentan niveles normales, además de que algunos pacientes asintomáticos podrían dar valores elevados de CK. Además, con frecuencia encontramos niveles elevados de alanina transaminasa (ALT), aspartato transaminasa (AST) y lactato deshidrogenasa (LDH).⁽⁶⁵⁾

1.3.6.2.2. Biopsia muscular

Estudios histológicos en la **biopsia muscular** de pacientes con EP muestran la presencia de vacuolas, utilizando la tinción de Hematoxilina-Eosina (HE). Además, éstas presentan en su interior grandes depósitos de glucógeno utilizando la tinción de Periodic Acid-Shiff (PAS) (**Figura 12**).

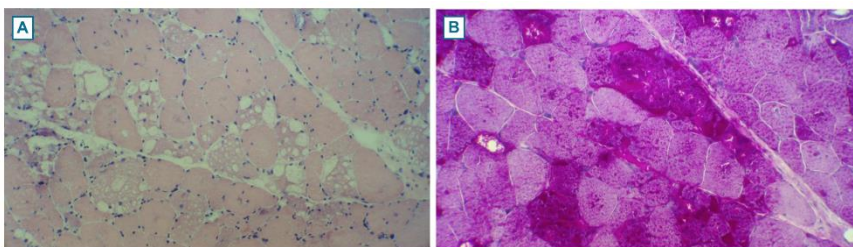


Figura 12. Biopsia del vasto lateral derecho de una mujer de 46 años con EPIT. **A:** Variación prominente del tamaño de las fibras musculares con núcleos centrales y vacuolas citoplasmáticas y subsarcolémicas de múltiples tamaños (HE 200x). **B:** Acúmulo pronunciado de glucógeno dentro de las vacuolas (PAS 200x). Modificación de Al Jasmi F et al⁽⁶⁵⁾.

Este almacenamiento de glucógeno y vacuolización de las fibras musculares se muestra con una menor frecuencia en los pacientes con EPIT en comparación con la EPI. Además, la ausencia de vacuolas PAS positivas en las biopsias musculares no descarta

la enfermedad. En estos casos puede ser de utilidad la realización de una tinción de fosfatasa ácida, que va a mostrar un incremento de la actividad lisosomal en fibras musculares. Por todo ello y por la obtención de muestra de tipo invasivo, esta prueba se realiza de manera complementaria.^(4,65,95)

1.3.6.2.3. *Actividad enzimática de GAA*

La **actividad enzimática** de la GAA se puede realizar en diferentes tipos de muestras biológicas, la más común es en sangre seca recogida en papel (llamada **gota seca**). Además, se puede realizar la prueba de actividad en cultivo de **fibroblastos**, realizando una biopsia de piel, en sangre periférica (**linfocitos**) y en biopsias de **músculo**. Estas muestras se ponen en contacto con un sustrato, llamado 4-metilumbeliferil- α -D-glucopiranosido, el cual por la acción de la GAA libera el producto 4-metilumbeliferona que se analiza por fluorimetría o por espectrofotometría de masas. Además, en este protocolo se añade acarbosa para inhibir la enzima maltasa glucoamilasa, la cual podría hidrolizar el sustrato proporcionándonos resultados erróneos. Contra menos producto resultante obtengamos menor es el % de la actividad enzimática.^(95,96)

1.3.6.2.4. *Genética*

El diagnóstico mediante la **secuenciación del gen GAA** es una prueba en la que encontrándose dos de las mutaciones en las dos copias del gen conlleva a la confirmación de la EP (véase punto 1.3.5). Esta técnica es muy útil para detectar portadores de una mutación en familia de afectados.⁽⁹⁷⁾

1.3.6.2.5. *Glucosa tetrasacárida en orina*

En los últimos años se ha utilizado la glucosa tetrasacárida (Glc4) en orina como biomarcador para monitorizar la respuesta al tratamiento. A pesar de no ser específico

para esta enfermedad, los niveles de Glc4 en orina elevados, junto a un déficit de GAA y a una clínica compatible, apoyan el diagnóstico de la enfermedad. El análisis de Glc4 se realiza mediante cromatografía líquida o espectrometría de masas.⁽⁹⁸⁾

1.3.7. Tratamiento

El tratamiento para la EP consiste, actualmente, en la terapia de reemplazo enzimático (TRE) junto con cuidados paliativos para tratar la sintomatología. No obstante, están en desarrollo nuevos avances terapéuticos.⁽⁹⁷⁾

1.3.7.1. Terapia de reemplazo enzimático

La TRE consiste en suministrar al paciente una proteína exógena que en su organismo no está siendo sintetizada de forma normal.

En el año 2006, la Agencia Europea del Medicamento (EMA) aprobó la utilización de un tratamiento de reemplazo enzimático para la EP. Éste consiste en administrar de manera intravenosa, cada 15 días, 20 mg/kg de una enzima recombinante de la GAA, llamada **α -glucosidasa humana recombinante (rhGAA)** conocida como Myozyme.⁽⁹⁹⁾

En estudios previos, se demostró que la membrana celular presenta receptores para el residuo manosa-6-fosfato (M6P), característico de las hidrolasas lisosomales, los receptores de M6P (MPR). Ese hecho llevó a elaborar una enzima que mimetiza a la GAA, es decir, que tiene la misma función y presenta los **residuos M6P** para poder ser incorporada en el lisosoma. Se realizaron diversos estudios que demostraban la validez de esta enzima recombinante que conseguía entrar en este orgánulo e hidrolizar el glucógeno en glucosa, mejorando los síntomas de los pacientes con EP.^(64,100)

En niños con fenotipo clásico de evolución rápida se han evidenciado resultados eficaces, con una reducción de la cardiomiopatía hipertrófica. En adultos se han visto beneficios a nivel motor, respiratorio y de fuerza muscular.

A pesar de los beneficios encontrados sobre este tratamiento, los resultados a medio y largo plazo presentan algunas controversias. En el caso de la forma de EPI, un estudio de la evolución del tratamiento en más de 10 años, realizado por Parini R et al, concluye que con el tiempo la TRE no logra estabilizar las mejoras clínicas impidiendo frenar la progresión de la enfermedad.⁽¹⁰¹⁾ En la forma EPIT, los resultados obtenidos presentan una variabilidad entre individuos bastante considerable causada por la variabilidad fenotípica que encontramos en este grupo. Por lo general, en los estudios realizados se describe que los beneficios disminuyen pasados los 3-5 años de tratamiento provocando la progresión de la EP.^(102,103)

La TRE también presenta varias limitaciones entre las que encontramos el elevado coste y la generación de anticuerpos contra esta enzima recombinante en parte de los pacientes. A pesar de ello, se ha demostrado que la titulación de anticuerpos baja o intermedia no presenta un gran impacto en la progresión de la enfermedad⁽¹⁰⁴⁾. También se ha podido observar, que la función muscular es la que menos se beneficia y diferentes estudios apuntan a que es debido al menor número y/o a la baja afinidad de los MPR en las fibras musculares.^(64,99,105-107)

Todas estas limitaciones en el actual tratamiento de la enfermedad provocan que se estén diseñando nuevos enfoques para mejorar la TRE.⁽⁷²⁾

1.3.7.2. Estrategias terapéuticas en desarrollo

Sanofi-Genzyme ha desarrollado una enzima de nueva generación (NCT02782741) para mejorar la actual TRE. La Avalglucosidasa α (**NeoGAA**) consiste en la enzima rhGAA de segunda generación en la que se le ha aumentado el número de residuos de M6P elevando así la afinidad por el receptor MPR.⁽¹⁰⁸⁾ Recientemente, se ha publicado que este estudio proporciona evidencias de mejoría clínica significativa en la función respiratoria, la deambulaci3n y la resistencia funcional.⁽¹⁰⁹⁾

Amicus Therapeutic ha desarrollado otra enzima artificial, **ATB200**, que se administra junto con una **chaperona**, AT2221, para estabilizar su estructura y la vida media de la enzima recombinante (NCT03729362).⁽¹¹⁰⁾ Los resultados obtenidos a corto plazo no evidencian mejoras significativas en comparación con la combinación de TRE y placebo.⁽¹¹¹⁾

En la actualidad, se están desarrollando estudios con **terapia génica** mediante inyección de vectores virales que llevan asociado el gen de GAA. El objetivo es restaurar la capacidad de producir GAA funcional al proporcionar a las células una copia funcional del gen GAA. Para ello se utilizan vectores de adenovirus asociados recombinantes (rAAV), que consisten en vectores a los que se les elimina los genes patogénicos y se les agrega el gen de interés, en este caso el GAA. Como virus, integra el gen en el genoma del paciente, proporcionando una nueva copia sin mutaciones del gen GAA que codifica para la proteína funcional.⁽⁷²⁾

La Universidad de Florida llevó a cabo el primer estudio (NCT00976352) en pacientes con EPI utilizando **rAAV1-CMV-hGAA**. El objetivo de este trabajo fue mejorar la función respiratoria mediante una inyección directamente en el diafragma. Los resultados reflejaron que el adenovirus era seguro y tolerado por los pacientes⁽¹¹²⁾. Además, en esta universidad se está llevando a cabo otro estudio (NCT02240407) para evaluar la acción de **rAAV9-DES-hGAA** combinándolo con tratamiento inmunomodulador, en pacientes con EPIT. Éste utiliza como promotor la desmina, para optimizar los niveles de expresión del transgén GAA en las fibras musculares. Estudios en ratones proporcionaron resultados exitosos, mostrando resultados de mejoría en la función cardiorrespiratoria.⁽¹¹³⁾ Además en otros estudios en ratón se evidenció una reducción en el acúmulo de productos autofágicos.⁽¹¹⁴⁾

Existen otras terapia en desarrollo, entre las que encontramos la terapia de reducción de sustrato y la estimulación de exocitosis lisosomal.⁽⁷²⁾

1.4. Biomarcadores

En 2001, se definió un biomarcador como una característica que se puede medir y evaluar objetivamente como un indicador de un proceso biológico o de una respuesta farmacológica a un tratamiento.⁽¹¹⁵⁾ En 2016, se actualizó la definición de biomarcador a una variante funcional o índice cuantitativo de un proceso biológico que predice o refleja la evolución o predisposición a una enfermedad o una respuesta a la terapia.^(116,117)

Un buen biomarcador ha de cumplir las siguientes características⁽¹¹⁵⁾:

- ✓ Ser fácil de cuantificar en material biológico de fácil accesibilidad y procedimientos invasivos.
- ✓ Su medición ha de ser fiable, rápida, reproducible y barata.
- ✓ Las concentraciones o la actividad del biomarcador no deben estar sujetas a grandes variaciones en la población general.
- ✓ Su expresión ha de estar específicamente alterada (elevada o reducida) en una patología en particular.
- ✓ No verse afectado por condiciones no relacionadas u otros factores.

La búsqueda de biomarcadores tiene un importante interés para establecer un diagnóstico, pronóstico y progresión de una enfermedad, así como para poder monitorizar el efecto del tratamiento actual.

1.4.1. miRNAs

Los **miRNAs** son moléculas pequeñas de ácido ribonucleico (RNA) no codificante de unos 18-21 nucleótidos (nt) que tienen como función la **regulación** de la expresión de genes a nivel postranscripcional. Los miRNAs se unen a las regiones no traducidas (UTR) 3', aunque en algunos casos se unen a los extremos 5', de los RNAs mensajeros (**mRNA**), provocando así su **degradación** o la **inhibición** de la traducción proteica. Por

ello, los miRNAs son reguladores idóneos de los mRNAs, incluyendo los que involucran diferentes procesos biológicos. Además, cada miRNAs no actúa de forma individual ni tiene un solo gen diana si no que los miRNAs tienen múltiples genes diana y cada uno de los mRNAs puede estar regulado por múltiples miRNAs.⁽¹¹⁸⁻¹²²⁾

La **síntesis** de miRNAs se inicia por la acción de la **RNA polimerasa II**, la cual es capaz de transcribir, a partir del DNA de nuestro genoma, cadenas largas de precursores primarios (**pri-miRNAs**). Algunos miRNAs maduros pueden compartir estas estructuras primarias. Los pri-miRNAs son procesados por una enzima nuclear ribonucleasa (RNAasa) tipo III denominada **Drosha** que por escisión forma los precursores de miRNAs (**pre-miRNAs**), que son moléculas de unos 60-80 nt que se encuentran plegadas entre sí formando una estructura en horquilla. Estas moléculas se transportan del núcleo al citoplasma mediante la **exportina-5** y una vez allí, la RNAasa de tipo III denominada **Dicer** la corta y forma un **miRNA de doble cadena** de unos 21 nt. Sólo una de las cadenas complementarias se une al complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), mientras que la otra queda inactiva o se degrada. El complejo RISC junto al miRNA se une al mRNA diana inhibiendo su traducción o causando su degradación (**Figura 13**).⁽¹²¹⁻¹²⁴⁾

Durante los últimos años se ha descrito que los miRNAs pueden ser detectables en diferentes **fluidos biológicos**, entre los que encontramos suero, plasma, saliva, orina, líquido cefalorraquídeo, etc. Además, la alteración de la expresión de miRNAs juega un papel muy importante en diferentes patologías utilizándose como **biomarcadores de varias enfermedades**, sobre todo en cáncer.^(125,126)

Algunos miRNAs regulan varios procesos en el ME como la proliferación y/o diferenciación celular, la atrofia o la regeneración muscular. Un grupo específico de miRNAs, conocidos como dystromiRs, se han encontrado altamente expresados en el suero de pacientes con distrofias musculares.⁽¹²⁷⁾

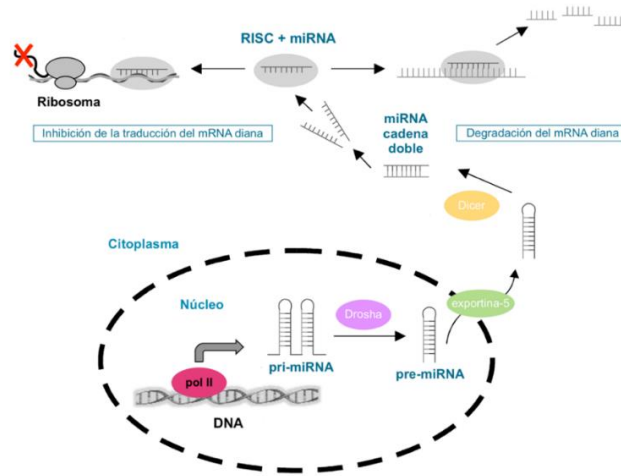


Figura 13. Esquema de la biogénesis de los miRNAs. Modificación de Seo MS et al⁽¹²⁴⁾.

1.4.2. miRNAs en músculo esquelético: dystromiRs

Durante los últimos años se ha descrito el papel que ejercen los miRNAs en los diferentes tejidos, encontrando un grupo muy característico expresado únicamente en corazón y en ME. A este grupo de miRNAs se les denominó **myomiRs** por su implicación en el músculo, incluyéndose entre ellos: miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-208a, miR-208b, miR-486, miR-499a y miR-499b. Durante los últimos años, tres de éstos han sido descritos en diferentes patologías musculares convirtiéndose en potenciales biomarcadores de diagnóstico y seguimiento de la enfermedad. Estos myomiRs son el miR-1, miR-133 y miR-206, y, al ser descritos en distrofias musculares, se los denominó **dystromiRs**.

En la presente tesis nos centraremos en este grupo de miRNAs dada su implicación en procesos de degeneración y regeneración muscular.^(128,129)

La **biogénesis** de los diferentes dystromiRs se encuentra muy relacionada ya que la mayoría comparten estructuras pri-miRNAs. Los miR-1 y miR-133a son sintetizados por el cromosoma 20 y 18. Por un lado, la región del cromosoma 20q13.33 contiene las

secuencias génicas de los miR-1-1 y miR-133a-2, localizadas en un intrón del gen *C20orf166* y sintetizadas en el mismo pri-miRNA. Por otro lado, la región del cromosoma 18q11.2 contiene las secuencias génicas de los miR-1-2 y miR-133a-1, localizadas en un intrón del gen *MIB1*. Las secuencias de las formas maduras del miR-1-1 y miR-1-2 son idénticas, al igual que las de miR-133a-1 y miR-133a-2. Por último, en la región cromosómica 6p12.2 se encuentra las secuencias génicas del miR-133b y miR-206 en una región intergénica. Como resultado, los dystromiRs están compuestos por 4 miRNAs maduros similares entre sí, el miR-133a y el miR-1 expresados en el ME y cardíaco, y el miR-133b y miR-206 expresados únicamente en ME (**Figura 14**).^(129–131)

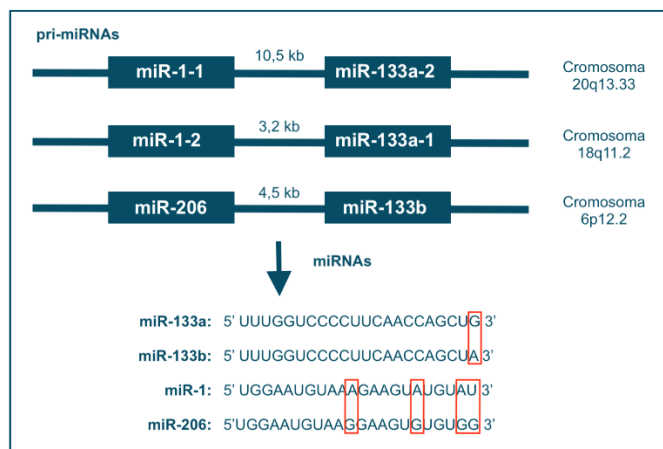


Figura 14. Localización de los pri-miRNAs y secuencias de las formas maduras de estos dystromiRs.

A continuación, se describen las funciones y la regulación de los dystromiRs en el ME.

1.4.2.1. *miR-133a y miR-133b*

Estos dystromiRs intervienen en los procesos de proliferación y diferenciación de los mioblastos en el ME (**Figura 15**).

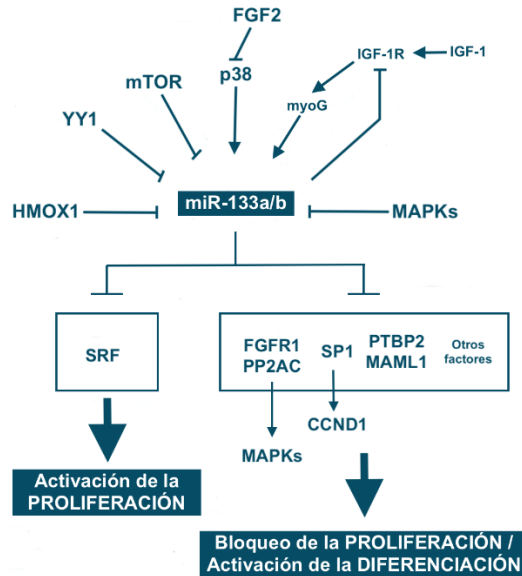


Figura 15. Regulación de miR-133a y miR-133b. Modificación de Horak M et al⁽¹²²⁾.

El papel fundamental de los miR-133a/b es el de potenciar la **activación y proliferación de los mioblastos**. Una de las dianas de estos dystromiRs es el factor de respuesta al suero (**SRF**), el cual es capaz de favorecer la diferenciación muscular inhibiendo la proliferación, por lo tanto al ser inhibido por miR-133a/b el balance final es favorable hacia la proliferación.^(119,132)

No obstante, los miR-133a/b también juegan un papel importante en la **diferenciación de los mioblastos**, ya que tiene como diana factores que intervienen en la proliferación vía **MAPK**, como FGFR1 y PP2AC, bloqueando este proceso. No obstante, el mismo proceso de proliferación vía MAPKs, regula negativamente la expresión de estos dystromiRs para evitar ser inhibida por estos mismos. Este balance pretende evitar una diferenciación prematura de manera que, en fases tempranas, estos miRNAs favorecen la proliferación de mioblastos y, a continuación, una sobreexpresión de éstos es capaz de bloquear este proceso y favorecer la diferenciación de estos mioblastos.

Un regulador potencial de esta transición es la señalización **p38** que mantiene a las células dentro del ciclo celular promoviendo la proliferación. Además, esta señalización

es un regulador positivo de los miR-133a/b, los cuales provocan la salida del ciclo celular mediante el bloqueo de ciclina C2 (CCND1), vía SP1, provocando la transición de proliferación a diferenciación celular.

HMOX1, YY1 y mTOR son algunos factores que regulan negativamente la transcripción de estos dystromiRs.^(118,122,123)

1.4.2.2. miR-1 y miR-206

El papel de estos dystromiRs en el músculo se focaliza principalmente en la **diferenciación y fusión de los mioblastos**, favoreciendo la formación de los miotubos (**Figura 16**).

miR-1 y miR-206 tienen como diana **factores proliferativos** de las CS, como Pax3 y Pax7, por lo que bloqueando la proliferación de células musculares provoca un balance positivo hacia la diferenciación. Además, estos miRNAs tienen como diana factores que inhiben la diferenciación celular, por lo tanto, al inhibirlos se promueve este proceso. Un claro ejemplo es la histona deacetilasa 4 (**HDAC4**) la cual inhibe la diferenciación celular inhibiendo el factor potenciador de miocito 2 (**MEF2**), por lo tanto al ser inhibida, la diferenciación puede darse sin problema.^(119,123)

Otras dianas que han sido descritas de estos dystromiRs son la utrofina (UTRN) y la folistatina (FST), las cuales son inhibidas favoreciendo la diferenciación y fusión temprana de los mioblastos. No obstante, la inhibición de HDAC4 provoca un aumento de la FST la cual está implicada en la función de la maduración favoreciendo la diferenciación avanzada de los miotubos.⁽¹³³⁻¹³⁵⁾

mTOR juega un papel fundamental en la regulación de la transcripción de estos dystromiRs, ya que es capaz de activar MEF2, siendo uno de los principales activadores de estos miRNAs junto con MyoD.

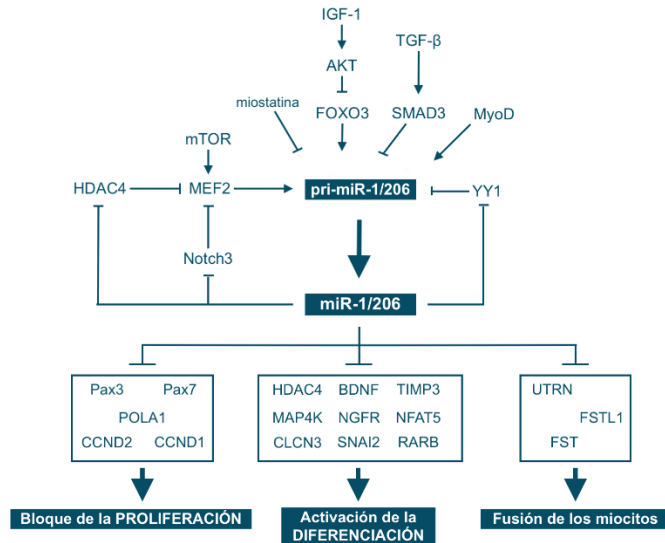


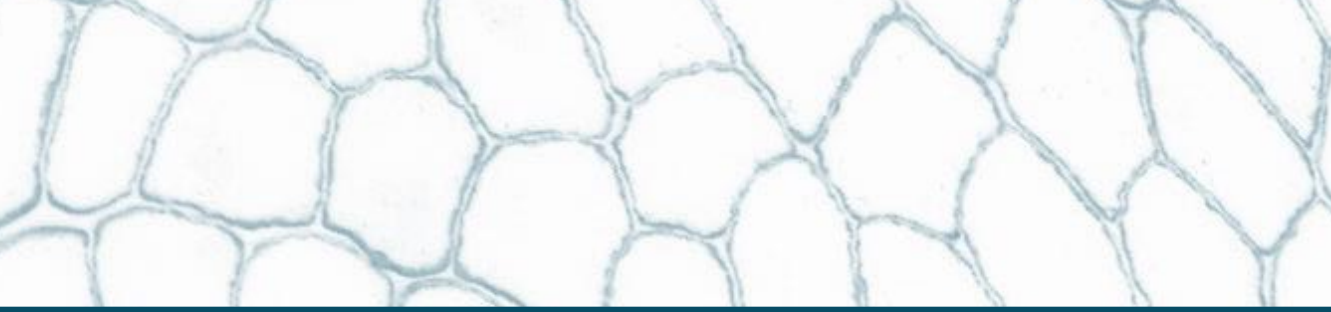
Figura 16. Regulación de miR-1 y miR-206. Modificación de Horak M et al⁽¹²²⁾.

En la regulación de miR-1 y miR-206 se ha descrito una retroalimentación positiva, en la que niveles altos de éstos promueven su transcripción inhibiendo a potenciales inhibidores propios, como YY1, o NOTCH3 y HDAC4, pudiendo promover su transcripción mediante MEF2.

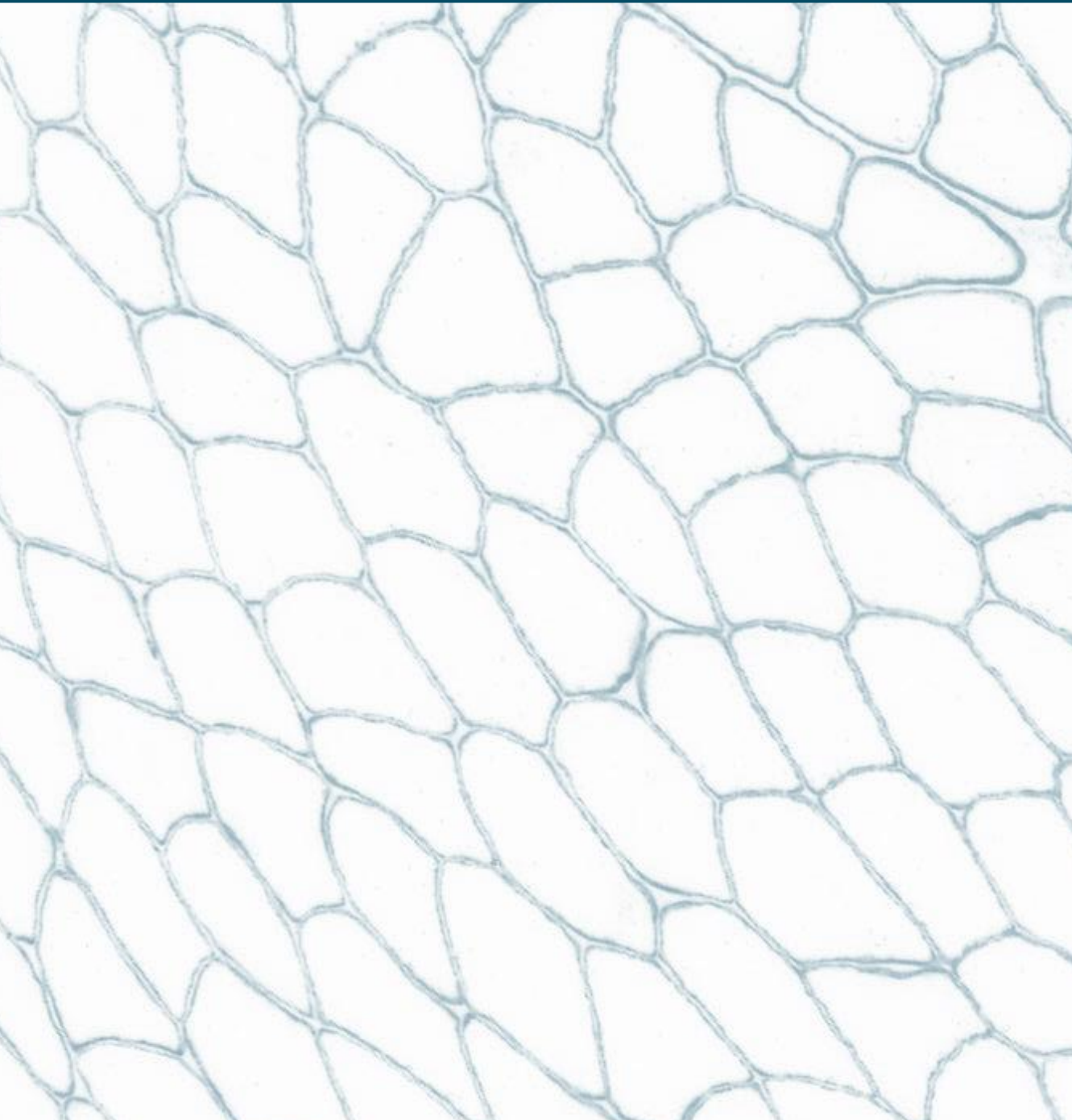
Un inhibidor importante de miR-1 y miR-206 es **TGF-β**, que por vía SMAD3, inhibe la transcripción del precursor de estos miRNAs, facilitando así la salida del proceso de diferenciación y promoviendo la fase de maduración de las fibras musculares. Esta fase también se promueve por la acción de la **miostatina** que también es capaz de inhibir la transcripción de estos dystromiRs.

Como ya se ha descrito **IGF-1** es un factor que promueve la proliferación celular, por lo tanto es capaz de inhibir la transcripción de estos dystromiRs vía activación de AKT y consecuente inhibición de FoxO3, factor promotor de estos miRNAs.^(118,119,122)

La implicación de estos miRNAs en el ME y su posible papel como biomarcadores en diferentes patologías son la razón de que el estudio del perfil de miRNAs en la EP sea uno de los objetivos de la presente tesis doctoral.



2. HIPÓTESIS



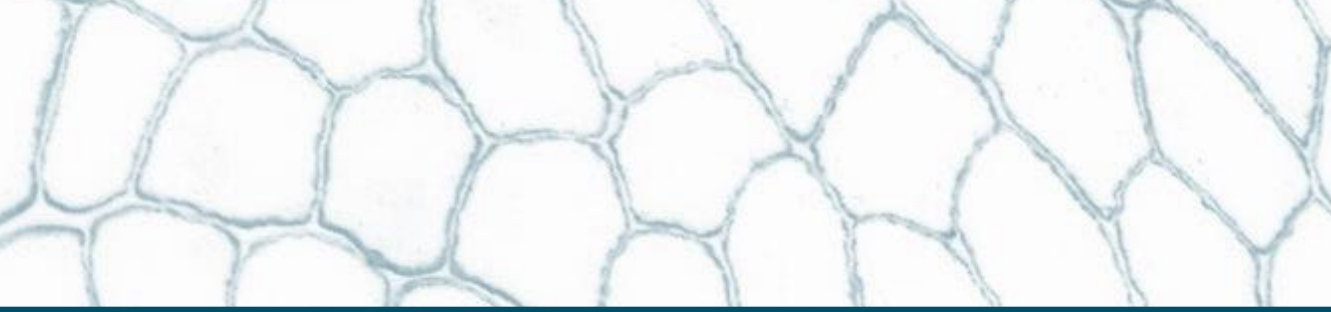
En la presente tesis se describen dos hipótesis:

HIPÓTESIS 1:

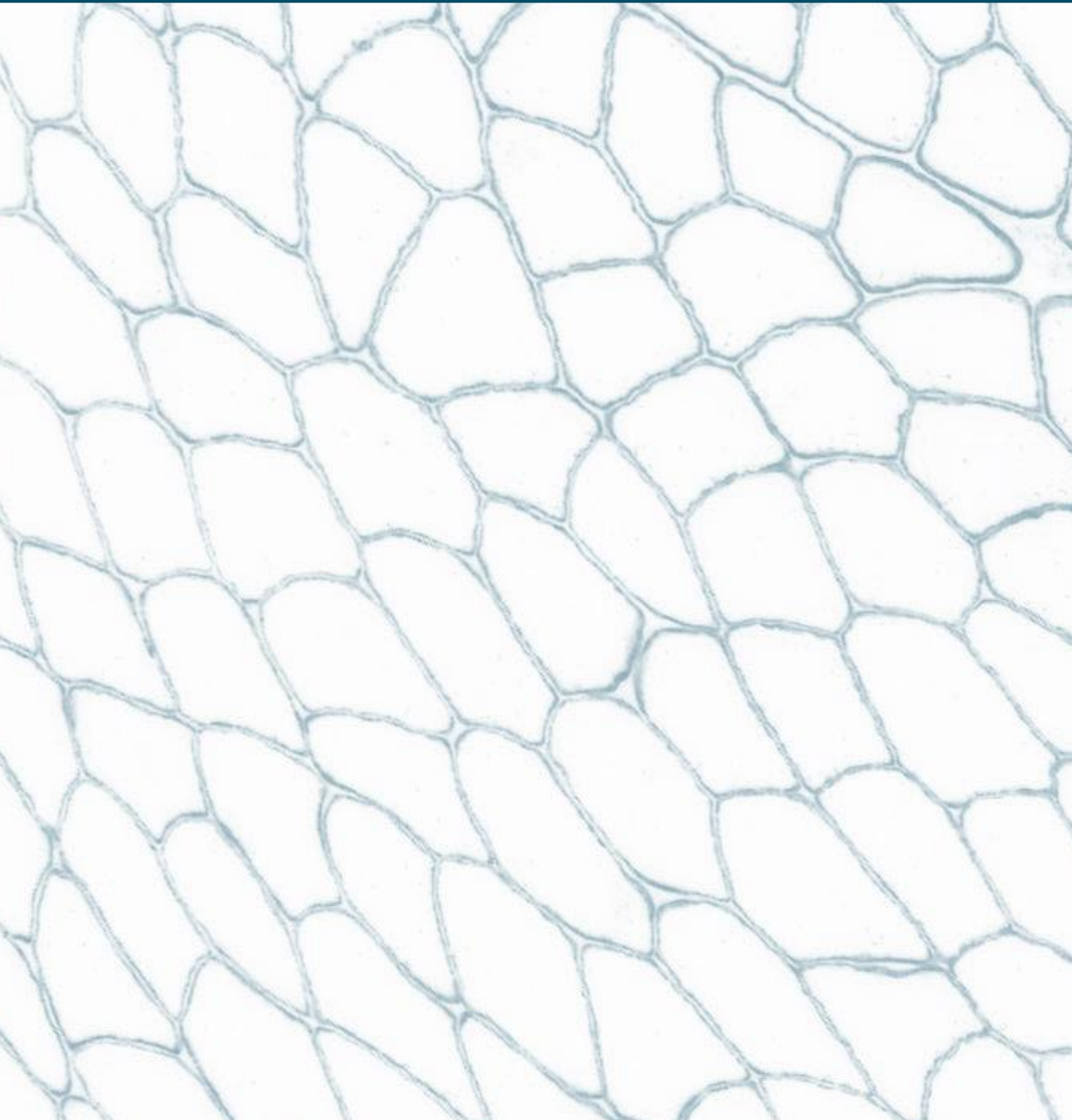
Existe un perfil característico de miRNAs en suero y músculo de pacientes con enfermedad de Pompe que puede ser utilizado como biomarcador de esta patología. Además, los niveles séricos de estos miRNAs correlacionan con los resultados de las pruebas funcionales musculares, reflejando de algún modo la situación estructural del músculo.

HIPÓTESIS 2:

El acúmulo de glucógeno en los lisosomas y vacuolas autofágicas lleva a la atrofia de las fibras musculares, siendo uno de los mecanismos fisiopatológicos básicos en la enfermedad de Pompe.



3. OBJETIVOS



OBJETIVO PRINCIPAL

El objetivo principal de la presente tesis es estudiar nuevos biomarcadores y mecanismos fisiopatológicos en la enfermedad de Pompe.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

- ◆ Estudiar el perfil de miRNAs en el suero y músculo de pacientes con EP, comparándolos con controles sanos.
- ◆ Correlacionar la concentración sanguínea de miRNAs con los resultados de las pruebas de función muscular y de RM cuantitativa de los pacientes con EP.
- ◆ Evidenciar si existe una correlación entre el número de vacuolas en el interior de las fibras musculares y el tamaño de éstas en las biopsias musculares de pacientes con EP y, además, estudiar qué marcadores de atrofia muscular se encuentran incrementados en las biopsias musculares de pacientes con EP.
- ◆ Estudiar los mecanismos de atrofia muscular en cultivos primarios de músculo esquelético de pacientes con EP.



4. MATERIAL Y MÉTODOS



4.1. Pacientes

Los resultados mostrados en la presente tesis, así como las muestras biológicas analizadas, han sido obtenidos mayoritariamente de pacientes provenientes de la Unidad de Enfermedades Neuromusculares del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP) de Barcelona. Adicionalmente, hemos incluido muestras de biopsias musculares obtenidas en el Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid, el Hospital Virgen del Rocío de Sevilla y el Hospital Universitario Ludwig Maximilian de Múnich.

Todos los pacientes que han participado en los estudios detallados a continuación han firmado un consentimiento informado y, además, los procedimientos realizados siguen las recomendaciones descritas en el Decreto de Helsinki. Los estudios funcionales siguen la regulación de ensayos clínicos y fueron aprobados por el Comité Ético del HSCSP.

Todos los pacientes incluidos tienen un diagnóstico confirmado de EP siguiendo los criterios diagnósticos establecidos por el *Consortio Europeo para la enfermedad de Pompe*⁽¹³⁶⁾.

En el primer estudio, donde se realiza un análisis del perfil de miRNAs en suero, existen dos cohortes principales, la de controles sanos (n=10) y la de pacientes con EPIT (n=35). Dentro de ésta última diferenciamos 3 subgrupos dependiendo de la sintomatología presentada y de si están en tratamiento con TRE. Los pacientes se definieron dentro del grupo de sintomáticos cuando se les identificó debilidad muscular en el examen clínico utilizando la calificación del MRC o cuando la CVF sentado fue inferior al 85%. De los 35 pacientes, 21 pacientes eran sintomáticos tratados con TRE, 9 sintomáticos sin tratamiento y 5 asintomáticos. En 3 de los pacientes sintomáticos sin tratar se realizaron extracciones sanguíneas antes y después del tratamiento para estudiar los niveles de miRNAs en la progresión de la enfermedad. Finalmente, se analizó la expresión de dystromiRs en biopsias musculares de pacientes con EPIT (n=4) y controles sanos (n=5).

Para el segundo estudio de la evaluación de los procesos fisiopatológicos en la EP se utilizaron biopsias musculares de pacientes con EPIT (n=12) y de controles sanos (n=4). La **Tabla 1** muestra las técnicas realizadas en biopsias musculares que se explican en puntos posteriores. Por otro lado, para los estudios en cultivo celular, se analizaron los mioblastos de 4 pacientes con EPIT y de 5 controles sanos.

Muestras de biopsia muscular	HE	IHQ	IF	RT-PCR
Músculo Pompe 1	✓	✓	✓	✓
Músculo Pompe 2	✓	✓	✓	✓
Músculo Pompe 3	✓	✓	✓	✓
Músculo Pompe 4	✓	✓	✓	✗
Músculo Pompe 5	✓	✓	✓	✗
Músculo Pompe 6	✓	✓	✓	✗
Músculo Pompe 7	✓	✗	✓	✗
Músculo Pompe 8	✓	✗	✓	✗
Músculo Pompe 9	✓	✗	✓	✗
Músculo Pompe 10	✓	✗	✓	✗
Músculo Pompe 11	✓	✗	✓	✗
Músculo Pompe 12	✓	✗	✓	✗
Músculo Control 1	✗	✓	✓	✓
Músculo Control 2	✗	✗	✗	✓
Músculo Control 3	✗	✗	✗	✓
Músculo Control 4	✗	✓	✓	✗

Tabla 1. Técnicas realizadas en cada una de las muestras de biopsia muscular en el estudio de los mecanismos fisiopatológicos en la EPIT. Entre éstas, encontramos la HE, IHQ, inmunofluorescencia (IF) y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR).

4.1.1. Muestras biológicas: suero y biopsia muscular

Las muestras biológicas realizadas en el estudio de miRNAs fueron de suero y biopsia muscular, y en el estudio de procesos fisiopatológicos se utilizaron biopsia muscular y células obtenidas de algunas de ellas.

Las biopsias musculares se realizaron como parte del proceso diagnóstico de los pacientes. En el caso de los controles sanos, los pacientes que se sometieron a cirugía ortopédica donaron muestras de biopsias musculares a nuestro biobanco.

Para los estudios histopatológicos, las biopsias musculares se congelaron en isopentano enfriado con nitrógeno líquido y se prepararon criosecciones. Para el análisis de western blot (WB) y expresión génica por RT-PCR, las biopsias musculares se congelaron directamente a -80 °C. Finalmente, para el cultivo celular, las biopsias musculares se limpiaron y cortaron en trozos de 1-2 mm y posteriormente se almacenaron en nitrógeno líquido hasta que se cultivaron.

4.1.2. Imagen muscular

Todos los pacientes, incluidos en el estudio de miRNAs, fueron examinados mediante RM en un Philips Achieva XR 1.5 Teslas ubicado en el HSCSP. Se adquirieron imágenes tridimensionales con la secuencia 2-punto Dixon y las regiones de interés (ROI) fueron dibujadas en las áreas de interés como se describió anteriormente.⁽⁹⁴⁾ La fracción media de grasa de los músculos se calculó a partir de los datos adquiridos y utilizados para el análisis estadístico.

4.1.3. Pruebas de función muscular

En los pacientes, incluidos en el estudio de miRNAs, se realizaron una serie de pruebas de función muscular, entre las que se incluyen: la prueba de 6MWT, el tiempo para caminar 10 metros, el tiempo de subida y bajada de 4 escalones, y la MFM- 20.

La fuerza muscular fue estudiada utilizando la escala MRC y miometría manual. Además, se utilizaron escalas complementadas por los pacientes de actividades de la vida diaria (ACTIVLIM) y otras escalas de calidad de vida vía cuestionarios INQoL y SF-36. La CVF en posición sentada y tumbada se obtuvo con un espirómetro Carefusion Microlab ML 3500 MK8 (Carefusion, Yorba Linda, CA, EE. UU).

4.2. Biología molecular

4.2.1. Cuantificación de miRNAs por PCR en tiempo real

4.2.1.1. miRNAs en suero

La extracción de miRNAs del suero se realizó usando el kit de DANAGENE de microRNA y RNA libre de células (DANAGEN, Badalona, Spain) utilizando MS2 RNA (Roche, Basel, Switzerland), como transportador para mejorar el aislamiento del RNA, y controles exógenos (Unisp2,4 y 5).

Los miRNAs fueron retrotranscritos en cDNA con el kit miRCURY LNATM Universal RT microRNA PCR (EXIQON). En este punto del experimento, se utilizaron como controles exógenos Unisp6 y cel-miR-39-3p.

Los estudios de expresión de miRNAs constaron de dos fases diferentes, una primera etapa de descubrimiento y, finalmente, la etapa de validación. Para la fase de descubrimiento, se seleccionaron 5 muestras de suero de 4 grupos diferentes:

controles sanos, pacientes con EPIT asintomáticos, pacientes con EPIT sintomáticos no tratados y pacientes con EPIT sintomáticos tratados. Para la fase de validación, se expandió la cohorte hasta 10 muestras de controles sanos y 35 pacientes con EPIT.

4.2.1.1.1. Fase de descubrimiento

En esta primera etapa, los miRNAs se analizaron mediante RT-PCR utilizando unos paneles preestablecidos de EXIQON denominados "*Serum/Plasma Focus microRNA PCR 384 wells Panels*" (V4.M) (EXIQON).

Los resultados se analizaron con el software Sequence Detection System (SDS) versión 2.4 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La media y la desviación estándar (DE) fueron calculadas y, finalmente, una empresa de consultoría experta en el análisis de datos de miRNAs llamada ANAXOMICS realizó un análisis estadístico de los datos sin procesar. Los niveles relativos de miRNAs séricos seleccionados se normalizaron usando cel-miR-39-3p y Unisp6 como controles exógenos⁽¹³⁷⁾ y los miRNAs; has-miR-126-3p, has-miR-151a-3p y has-miR-21-5p, como controles endógenos identificados mediante la aplicación del algoritmo geNorm⁽¹³⁸⁾, un método basado en la estabilidad por pares descrito anteriormente.⁽¹³⁹⁾

4.2.1.1.2. Fase de validación

Los miRNAs identificados en la fase de descubrimiento fueron posteriormente estudiados en la fase de validación. Se utilizó ExiLENT SYBR Green master mix (QIAGEN, Venlo, Netherlands) y los ensayos individuales de miRCURY LNA miRNA PCR Assays (QIAGEN) para estudiar cada uno estos miRNAs.

Se analizaron, para todas las muestras, un total de 21 miRNAs: 14 miRNAs problema, 1 miRNA endógeno como normalizador, 2 miRNAs controles de hemólisis y 4 miRNAs controles exógenos. El miR-126-3p se utilizó como endógeno para normalizar los

datos. De los 14 miRNAs problema, 9 fueron seleccionados en la etapa previa y otros 5 añadidos al estudio por su implicación en la patología del músculo.

Como se disponía de muestra de suero previa y posterior a la TRE de 3 pacientes sintomáticos, se decidió estudiar los niveles de algunos de los miRNAs en la progresión de la enfermedad.

La expresión relativa de miRNAs se analizó utilizando el método Ct comparativo con el software SDS 2.4.⁽¹⁴⁰⁾

4.2.1.2. miRNAs en músculo

Los niveles de expresión de algunos de los miRNAs se analizaron en biopsias musculares obtenidas de pacientes con EPIT (n=4) y de controles sanos (n=5).

La extracción de éstos miRNAs se realizó utilizando el kit de microRNA DANAGEN (DANAGEN). Para esta técnica, también usamos MS2 (MS2 RNA, Roche) y los controles exógenos para el aislamiento de miRNAs.

Para el análisis de la expresión de miRNAs en músculo, se utilizó la ExiLENT SYBR Green master mix (QIAGEN) y miRCURY LNA miRNA PCR Assays (QIAGEN) para cada miRNA. Para este tipo de muestras se utilizó U6 snRNA (RNU6-2) como control endógeno para normalizar los datos.⁽¹⁴¹⁾

La **Tabla 2** recoge los diferentes ensayos analizados por RT-PCR, entre los que se incluyen: los controles exógenos sintéticos añadidos en diferentes puntos del experimento, los miRNAs utilizados como controles endógenos y los miRNAs de estudio.

Ensayos de miRNAs estudiados	Suero	Biopsia muscular
Controles exógenos de la extracción de miRNAs	Unisp2, Unis4 y Unisp5	
Controles exógenos de la retrotranscripción	Unisp6 y cel-miR-39-3p	
Controles endógenos	miR-126-3p	RNU6-2
miRNAs de estudio	miR-1-3p, miR-106b-5p, miR-133a-3p, miR-145-5p, miR-181a-5p, miR-186-5p, miR-199a-5p, miR-206, miR-23a-3p, miR-29-3p, miR338-3p, miR-423-5p, miR-486-5p y miR-652-39	miR-1-3p, miR-133a-3p y miR-206

Tabla 2. Ensayos individuales de miRNAs para RT-PCR utilizados en muestras de suero en la fase de validación y en muestras de biopsia muscular.

4.2.2. Cuantificación de mRNA por PCR en tiempo real

4.2.2.1. *Expresión génica en músculo*

Para estudiar la expresión de algunos atrogenes en las biopsias de pacientes con EPIT, se realizaron extracciones de RNA total con Rneasy® Micro Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se determinó la concentración de RNA utilizando un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). El DNA complementario (cDNA) se sintetizó a partir de 0.5 µg de RNA total utilizando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems.) y la RT-PCR de cDNA se realizó utilizando Taqman Universal PCR Master Mix y el 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Los niveles de expresión de mRNA se cuantificaron utilizando sondas Taqman (Applied Biosystems) de los siguientes genes: *BNIP3* (Hs00969291_m1), *FBXO32/Atrogin-1* (Hs01041408_m1), *TRIM63/MuRF-1* (Hs00822397_m1) y *GAPDH* (Hs99999905_m1). El ensayo de *GAPDH* se utilizó como control endógeno para normalizar la expresión del resto de genes y se analizó la cuantificación relativa de todos ellos utilizando el método Ct comparativo con el software SDS v2.4 (Applied Biosystems).⁽¹⁴⁰⁾

4.2.2.2. Expresión génica en miotubos

Los ensayos de expresión génica en miotubos se realizaron utilizando el kit Taqman Fast Advanced Cells-to-CT (Thermo Fisher Scientific) después de 0, 3, 6 y 9 días de diferenciación (véase punto 4.3.1).

Los niveles de expresión de mRNA se estudiaron utilizando sondas Taqman (Applied Biosystems) de los siguientes genes: *BNIP3* (Hs00969291_m1), *FBXO32/Atrogin-1* (Hs01041408_m1), *MYOD1* (Hs00159528_m1), *MYOG* (Hs01072232_m1), *MYH1* (Hs000418)6 y *GAPDH* (Hs99999905_m1). Al igual que en la expresión génica de las biopsias musculares, los resultados se normalizaron con el control endógeno *GAPDH* y la cuantificación relativa de todos los genes se analizó mediante el método Ct comparativo con el software SDS 2.4.⁽¹⁴⁰⁾

4.3. Ensayos in vitro

4.3.1. Cultivos primarios humanos de biopsia muscular

Para los estudios de cultivo celular, se aislaron mioblastos primarios de biopsias de músculo humano que se procesaron y cultivaron de acuerdo con el método descrito por la Dra. Askanas.⁽¹⁴²⁾ De manera resumida, las piezas de músculo se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ y 5% de O₂ en un medio de proliferación que contenía Dulbecco's

Modified Eagle's Medium (DMEM) y M-199 (en proporción 3:1), 15% de suero fetal bovino (FBS) (todos de Gibco, Thermo Fisher Scientific), L-glutamina 2 mM (Lonza, Basel, Switzerland), 12.5 ng/ml de factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF) (ambos de Peprotech, Rocky Hill, NJ) y penicilina-estreptomicina al 1% (Lonza).

Los mioblastos se aislaron utilizando el anticuerpo anti-CD56-PE humanos (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany) y el BD FACSAria Cell Sorter (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

Para analizar la proliferación, se sembraron mioblastos a 5,000 células/cm² utilizando el ensayo de incorporación de BrdU (Roche) en 3 días diferentes (a las 24, 48 y 72 horas).

Para WB e IF, se sembraron mioblastos a 8,000 células/cm². En el caso de las IF, las células se sembraron en cubreobjetos recubiertos con gelatina al 0.15% para analizar la formación de miotubos. Para inducir la diferenciación de mioblastos y la formación de miotubos, el medio se cambió a medio bajo en suero (2% de FBS) sin factores de crecimiento durante 9 días.

4.3.2. Cultivo y transfección de mioblastos inmortalizados

El efecto de BNIP3 en el desarrollo de miotubos se estudió utilizando mioblastos inmortalizados de controles sanos proporcionados por el Dr. Mouly del Institut de Myologie (Paris, France).⁽¹⁴³⁾

Los mioblastos se expandieron usando medio de músculo esquelético (SMM) (Promocell, Heidelberg, Germany) y se transfectaron con el plásmido pGFP-BNIP3 (RG205087, Origene, Rockville, MD, USA) utilizando la unidad 4D-Nucleofector™ y el kit P5 Primary Cell 4D-Nucleofector™ (Lonza). Además, los mioblastos inmortalizados se transfectaron con el plásmido pmaxGFP™ (proporcionado por el kit P5) como control de transfección y para determinar si las diferencias en la formación de

miotubos fueron causadas por el plásmido BNIP3 o por el proceso de transfección. Una vez transfectadas, las células positivas para la proteína fluorescente verde (GFP) se seleccionaron utilizando el BD FACSAria Cell Sorter. Para este estudio, se utilizaron tres grupos de estudio diferentes: células no transfectadas, transfectadas con GFP y transfectadas con BNIP3.

Una vez obtenida la población positiva para el plásmido de BNIP3, los mioblastos se sembraron en cubreobjetos recubiertos con gelatina al 0.15% hasta lograr una confluencia mayor a 90%, momento en el cual se realizó un cambio de medio al de diferenciación, mencionado anteriormente, durante 9 días.

Finalmente, y después de la formación de miotubos, se estudió la morfología de éstos comparando las áreas de miotubos entre grupos. Adicionalmente, el índice de fusión se determinó como el porcentaje de núcleos incluidos en miotubos que expresan MF-20 (que contienen al menos 3 núcleos) dividido entre el número total de núcleos.

4.4. Western Blot

Una vez completado el proceso de diferenciación de los mioblastos, se recogieron pellets de miotubos y se lisaron en tampón RIPA (Sigma-Aldrich) que contenía un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Roche). Los lisados celulares se centrifugaron a 4°C y 13,000xg durante 20 min y se obtuvieron los sobrenadantes que fueron guardados a -80 °C. La proteína total se cuantificó utilizando el kit de ensayo Precision Red protein (Cytoskeleton, Denver, CO, USA).

Una vez obtenidas las proteínas totales del lisado, se cargaron 50 µg en geles Mini-PROTEAN® TGX™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa con el kit Trans-Blot Turbo RTA Mini Nitrocellulose Transfer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Las membranas se bloquearon en caseína diluida 1:1 en TBS y se incubaron con anticuerpos primarios y secundarios como se muestra en la

Tabla 3.

Anticuerpo primario	Huésped	Dilución	Técnica	Referencia	Marca comercial
MuRF1/TRIM63	Mouse monoclonal	1/200 y 1/500	IHQ y WB	NBP2-52515	Novus Biologicals
FbxO32/Atrogin-1	Rabbit monoclonal	1/100	IHQ	ab168372	Abcam
BNIP3	Mouse monoclonal	1/100	IHQ e IF	ab10433	Abcam
Citocromo-C	Mouse monoclonal	1/250	IHQ	12963S	Cell Signalling
Miosina Rápida	Rabbit policlonal	1/200	IF	ab91506	Abcam
ULK1-p (Ser317)	Rabbit policlonal	1/100	IHQ e IF	PA5-104556	Invitrogen
AMPK-p (Thr172)	Rabbit monoclonal	1/50	IF	2535	Cell Signalling
FUNDC1	Rabbit policlonal	1/100	IHQ e IF	NBP1-81063	Novus Biologicals
HIF-1α	Rabbit monoclonal	1/100	IF	ab51608	Abcam
LC3B	Rabbit policlonal	1/500	WB	2775S	Cell Signalling
p62	Rabbit policlonal	1/250	IF y WB	BML-PW9860-0100	Enzo Life Science
B-actina	Mouse monoclonal	1/2,000	WB	A5441	Sigma-Aldrich
MyHC (MF-20)	Mouse monoclonal	1/100	IF	MAB4470	Novus Biologicals
Anticuerpo secundario	Conjugación	Dilución	Técnica	Referencia	Marca comercial
GAM biot	N/A	1/200	IHQ	31800	Invitrogen
GAR biot	N/A	1/200	IHQ e IF	31820	Invitrogen
GAR	Alexa 488	1/200	IF	A11008	Invitrogen
GAM	Alexa 594	1/200	IF	A11005	Invitrogen
Estreptavidina	Alexa 594	1/200	IF	S11227	Invitrogen
GAR	Alexa 594	1/200	IF	A11037	Invitrogen
Hoescht 33342	N/A	1/10,000	IF	H3570	Invitrogen
GAR	IRDye 800	1/7,500	WB	926-32211	LI-COR
GAM	IRDye 680	1/7,500	WB	928-68070	LI-COR

Tabla 3. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en el estudio de la fisiopatología de la EP. Animales huéspedes y reconocidos expresados en inglés. Biot = biotinilado, GAM = Goat anti-human, GAR = Goat anti-rabbit y N/A = sin información.

Finalmente, las membranas se visualizaron usando un Odyssey Imaging System (LI-COR). La cantidad de proteína se cuantificó utilizando el software Image Studio Lite (LI-COR) y los niveles de proteína se expresaron en relación a la β -actina.

4.5. Histología, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Con respecto a la **histología**, se realizaron tinciones de HE en criosecciones de 12 biopsias musculares de pacientes con EPIT. Una vez obtenidas las imágenes requeridas, se sometieron a una evaluación con la finalidad de estudiar la presencia de vacuolas. Para ello, se analizaron aleatoriamente más de 80 fibras musculares por cada biopsia y las clasificamos con una puntuación de 0 a 4 según la presencia y tipo de vacuolas (**Figura 17**). La puntuación de 0 indica que no había presencia de vacuolas dentro de las fibras musculares, las puntuaciones de 1 y 2 indican la presencia de pequeñas vacuolas y, finalmente, las puntuaciones de 3 y 4 indican grandes vacuolas dentro de las fibras musculares llenando el sarcoplasma.

En estas mismas fibras se midió el diámetro mínimo de Feret (Min Feret) utilizando el software ImageJ. Finalmente, se realizaron correlaciones entre el tamaño de la fibra y el tipo de puntuación obtenido en la escala.

La tinción con rojo de alizarina se realizó para visualizar la presencia de depósitos de Ca^{++} en las biopsias musculares de pacientes con EPIT. Se utilizó una biopsia muscular de un paciente con distrofia muscular de Duchenne (DMD) como control positivo de esta técnica.

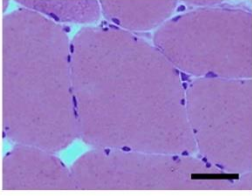
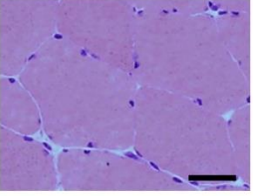
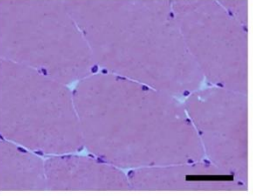
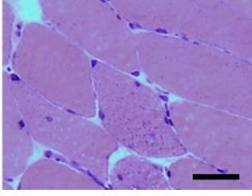
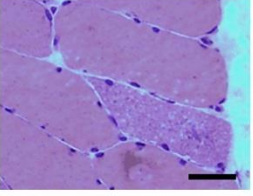
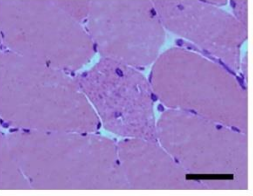
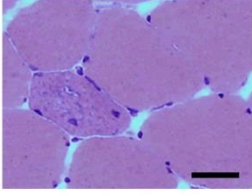
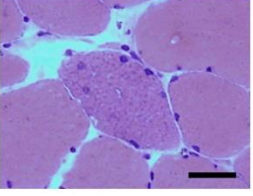
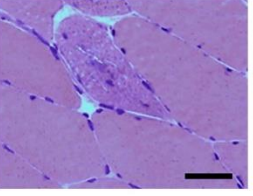
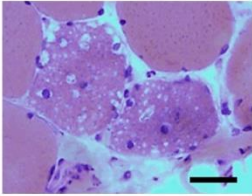
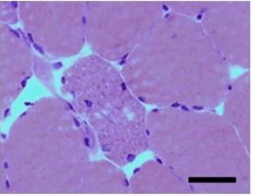
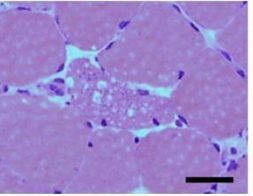
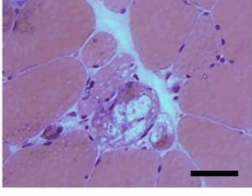
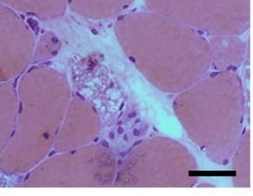
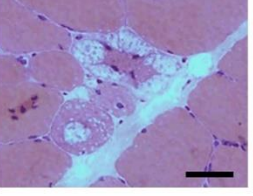
Puntuación	Morfología		
0			
1			
2			
3			
4			

Figura 17. Escala con puntuaciones de 0 a 4 según la presencia y tipo de vacuolas en las fibras musculares de pacientes con EPIT. Barra de escala=50 μm .

Para los estudios de **IHQ**, las secciones de tejido se fijaron con una solución de acetona:etanol fría (1:1), se lavaron con solución salina tamponada con Tris (TBS) y se trataron con peróxido de hidrógeno al 3%. Para permeabilizar y bloquear el tejido, las secciones se trataron con una solución de albúmina de suero bovino al 1% y Tritón al 2% diluidos en TBS y se incubaron con el reactivo de bloqueo UltraCruz (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Las secciones de músculo se incubaron con anticuerpos primarios y secundarios, siguiendo los criterios mostrados en la **Tabla 3**. El producto de reacción se visualizó utilizando los kits de sustrato VECTACTAIN® Elite ABC-HRP e ImmPACT® DAB (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Finalmente, las secciones de tejido se lavaron con agua destilada, se contratiñeron con hematoxilina durante 1 min y se montaron con Aquatex (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA).

Para esta técnica, se utilizó una biopsia muscular de un paciente con Dermatomiositis (DM) como control positivo para la presencia de los diferentes atrogenes: BNIP3, Atrogin-1 y MuRF-1, ya que se ha informado atrofia perifascicular en estos pacientes.^(144,145)

Para los estudios con la técnica de **IF**, las criosecciones se fijaron con acetona, se lavaron con TBS y se incubaron en solución de bloqueo UltraCruz Blocking Reagent (Santa Cruz). Posteriormente, las secciones de tejido se incubaron con anticuerpos primarios y secundarios como se muestra en la **Tabla 3**. Además, para el estudio de expresión de BNIP3 por IF, se incluyeron biopsias de 3 pacientes con enfermedad de motoneurona para estudiar si las fibras denervadas expresaban BNIP3.

Para detectar la apoptosis a nivel de una única célula, se utilizó la tecnología fluorométrica TdT-UTP nick-end labeling (TUNEL) junto al kit In Situ Cell Death Detection (Roche) según las instrucciones del fabricante. Finalmente, las secciones se montaron con Fluoromount (Sigma-Aldrich).

Para realizar **IF en miotubos** después de 9 días de diferenciación, los cubreobjetos con miotubos se fijaron con etanol, se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se incubaron con el reactivo de bloqueo UltraCruz (Santa Cruz). Los miotubos se incubaron con anticuerpo anti-cadena pesada de miosina (MyHC) y con GAM Alexa 594 como se muestra en la **Tabla 3**. Finalmente, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con Vectashield con DAPI (diamidino-2-fenilindol) (Vector Laboratories).

Todas las imágenes se obtuvieron usando un microscopio Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Japan) acoplado a una cámara DP72 o un microscopio Leica Confocal SP5 AOBS (Leica). Para crear combinaciones de imágenes y estudiar la co-expresión de dos marcadores se utilizó el software ImageJ.

4.6. Análisis estadístico

4.6.1. Fase de descubrimiento del estudio de miRNAs

En la primera fase del estudio del perfil de miRNAs, se realizaron pruebas ANOVA para identificar diferencias en los niveles de expresión de miRNAs entre las diferentes cohortes. Los valores de p se ajustaron para pruebas múltiples utilizando la corrección de Tukey-Kramer. El conjunto de datos con todas las variables de los pacientes individuales se analizó utilizando una estrategia de ciencia de datos basada en un enfoque de extracción de datos, en el que se utilizaron los siguientes métodos: selección de características y extracción de algoritmos CHOW-LIU, MRMR, RELIEFF, RFE-SVM, SFFS y Wilcoxon con correlación y, como clasificador base, GLM_Binomial y Naïve Bayes.⁽¹⁴⁶⁻¹⁵¹⁾ Para priorizar la capacidad de generalización de la conclusión, se realizó un análisis de validación de K-fold, que arrojó medidas de calidad con validación cruzada (como la precisión) para cada biomarcador.

4.6.2. Fase de validación del estudio de miRNAs

Para la fase de validación se utilizaron pruebas no paramétricas para el análisis estadístico de las variables. Se realizó la prueba U de Mann-Whitney para evaluar si había diferencias significativas en las variables entre grupos, por un lado, entre controles y pacientes con EPIT y, por otro lado, entre los tres grupos de pacientes con EPIT (asintomáticos, sintomáticos tratados y sintomáticos sin tratar).

En el caso de los miRNAs en biopsia muscular, también se realizó la prueba de U de Mann-Whitney para estudiar las diferencias entre dos cohortes, controles sanos y pacientes con EPIT.

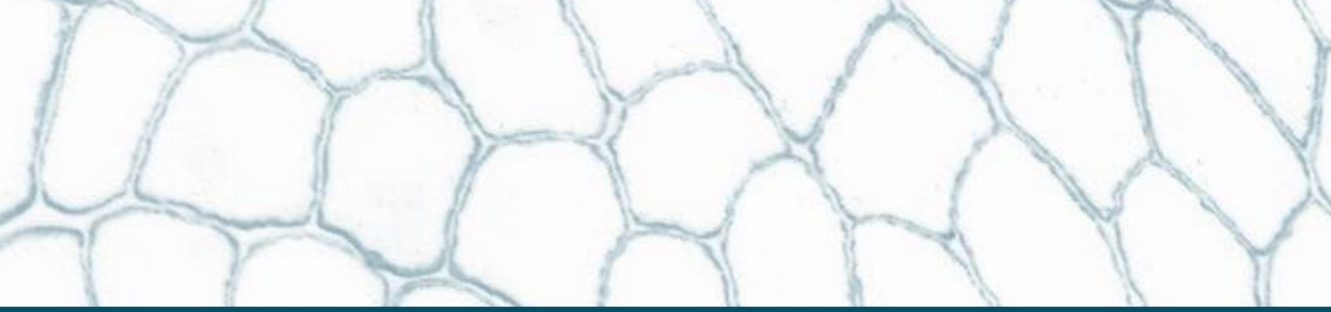
4.6.3. Correlaciones clínicas

La prueba no paramétrica de Spearman se utilizó para analizar las correlaciones entre la expresión de miRNAs en suero y los resultados aportados por las pruebas funcionales y la imagen muscular. Para eliminar errores de las múltiples correlaciones, se utilizó la prueba de Bonferroni. Los estudios estadísticos se realizaron con el software IBM SPSS® Statistics versión 21 y los resultados de todos los estudios estadísticos se consideraron significativos cuando p era inferior a 0.05.

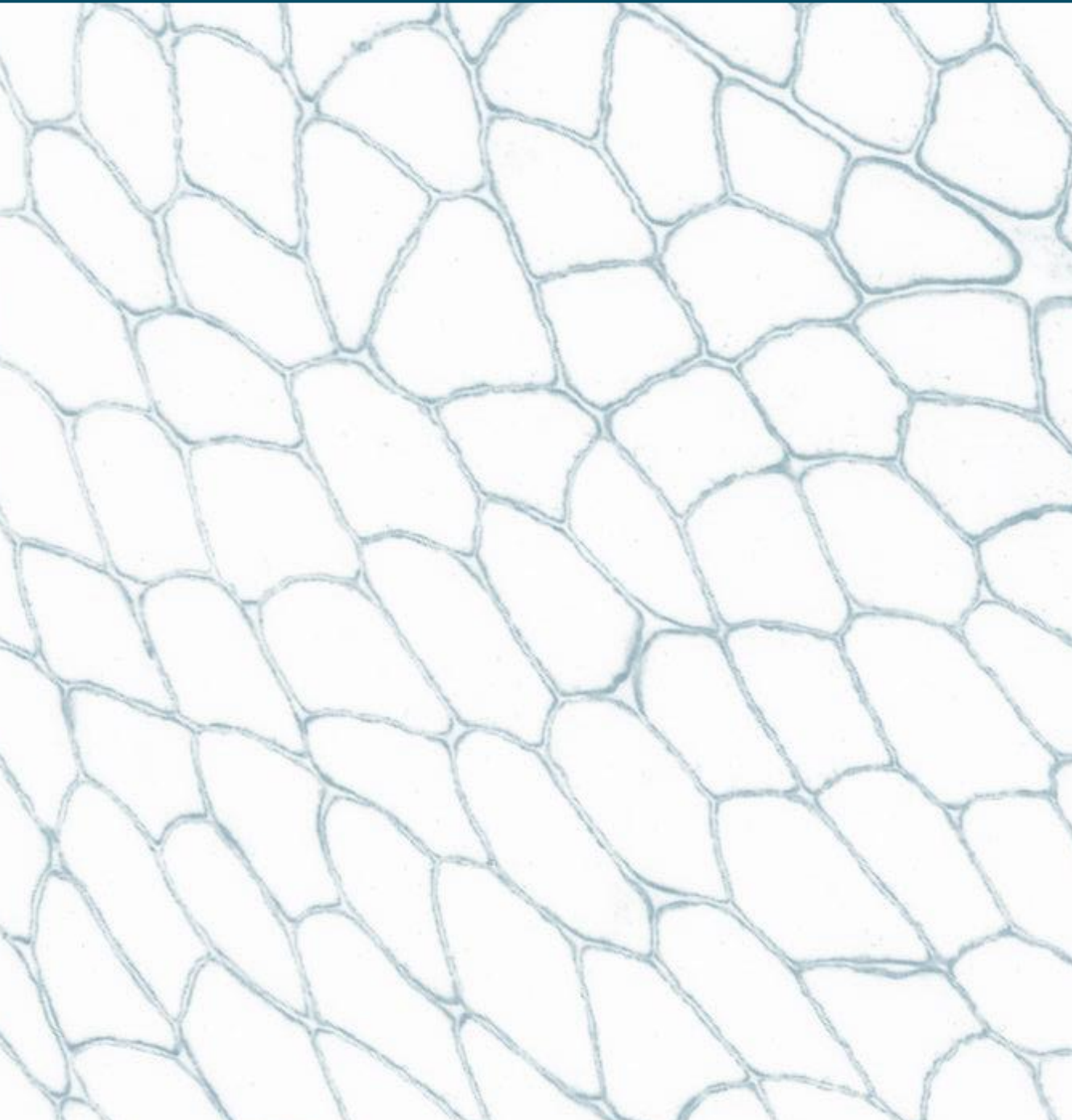
4.6.4. Estudio de mecanismos fisiopatológicos de la EP

La creación de gráficos y los análisis estadísticos se produjeron utilizando el software GraphPad Prism 8.0. Los datos se expresaron como la media \pm DE, y las comparaciones y comparaciones múltiples se realizaron mediante la prueba de Mann-Whitney y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, respectivamente. Se utilizó la prueba de Greenhouse-Geisser para comparar la expresión de genes miogénicos entre las dos

cohortes de controles sanos y pacientes con EPIT en la diferenciación de miotubos. Se consideró significativo un valor de p inferior 0.05.



5. RESULTADOS



A diferencia del apartado de material y métodos, que se ha desarrollado teniendo en cuenta la tipología de las técnicas, los resultados se han dividido en dos grandes apartados teniendo en cuenta los dos estudios principales de la tesis doctoral: la identificación de miRNAs y el estudio de mecanismos fisiopatológicos en la EP, concretamente procesos ligados a la atrofia muscular en la enfermedad.

5.1. Identificación de miRNAs en pacientes con EP

5.1.1. Descripción de la cohorte de pacientes

La **Tabla 4** recoge los datos relacionados con la descripción y las características clínicas de las diferentes cohortes utilizadas en este estudio.

Características clínicas	Controles sanos (n=10)	Pacientes asintomáticos (n=5)	Pacientes sintomáticos no tratados (n=9)	Pacientes sintomáticos tratados (n=21)
Edad	41.2 ± 16.4	24 ± 8.2	50.6 ± 11.4	50.81 ± 8.6
Sexo (hombre/mujer)	6/4	2/3	6/3	7/15
Tiempo desde el inicio de los síntomas	-	-	9.4 ± 6.6	15 ± 9.1
Tiempo en TRE	-	-	-	5.1 ± 2.5
Ayuda para caminar	-	-	0	10
Ventilación	-	-	2	9

Tabla 4. Características clínicas de las cohortes utilizadas para el estudio de miRNAs.

5.1.2. Expresión de miRNAs en suero

En la primera **fase de descubrimiento**, observamos diferentes niveles de expresión entre los grupos de estudio en 9 de los 185 miRNAs incluidos en el ensayo de descubrimiento (ANOVA, $p < 0.05$). Los niveles de expresión de estos 9 miRNAs se analizaron más a fondo en la fase de validación. Éstos fueron los siguientes: miR-106b-5p, miR-199a-5p, miR-652-3p, miR-423-5p, miR-1-3p, miR-133a-3p, miR-186-5p, miR-338-3p y miR-23a-3p. Además, incluimos en la fase de validación un grupo de miRNAs que están involucrados en el proceso de degeneración muscular: miR-206, miR-145-5p, miR-181-5p, miR-486 y miR-29a-3p.⁽¹⁵²⁾

En la segunda **fase de validación**, en cuanto a los resultados de los 3 dystromiRs, observamos un aumento estadísticamente significativo en los niveles de expresión de miR-1-3p y miR-206 entre las dos grandes cohortes: pacientes con EPIT y controles sanos (**Figura 18A y C**).

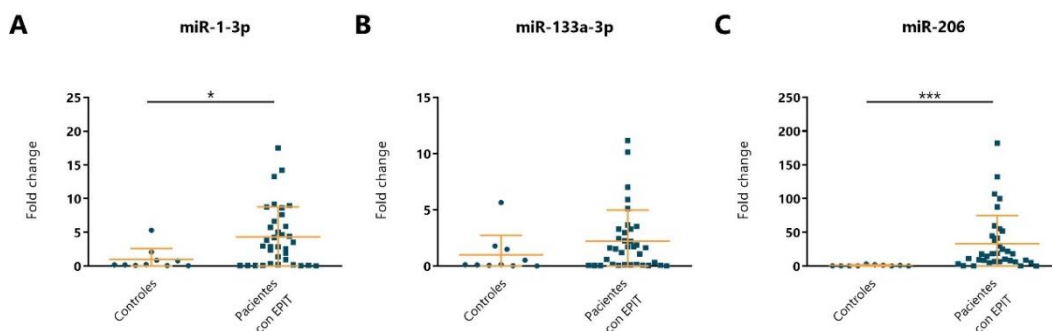


Figura 18. Comparativa de los niveles de expresión sérica de dystromiRs entre pacientes con EPIT y controles sanos. Los datos representados corresponden al valor de *Fold change* y se representan como media \pm DE. * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$.

También analizamos si existían diferencias entre los 4 subgrupos de estudio: pacientes asintomáticos, pacientes sintomáticos no tratados, pacientes sintomáticos tratados y controles. Tal y como se observa en la **Figura 19**, los resultados mostraron diferencias significativas en la expresión de miR-1-3p, miR-133a-3p y miR-206 entre los pacientes sintomáticos tratados y el grupo control. En los niveles de expresión de miR-206, también observamos diferencias significativas entre controles y pacientes sintomáticos no tratados además de entre pacientes asintomáticos y sintomáticos tratados (**Figura 19C**).

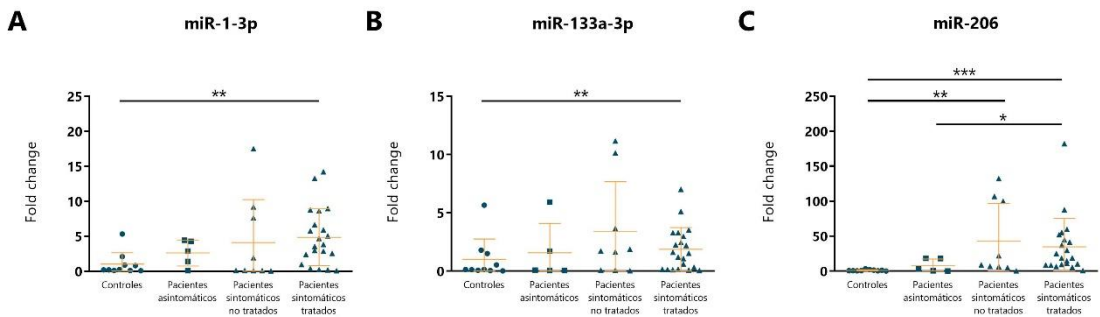


Figura 19. Comparativa de los niveles de expresión sérica de dystromiRs entre los controles sanos y las diferentes cohortes de pacientes con EPIT. Los datos representados corresponden al valor de *Fold change* y se representan como media \pm DE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

A pesar de que identificamos otros miRNAs potenciales en la fase de descubrimiento y añadir otros al estudio de validación, ninguno de ellos mostró diferencias significativas en esta fase (**Figura 20**).

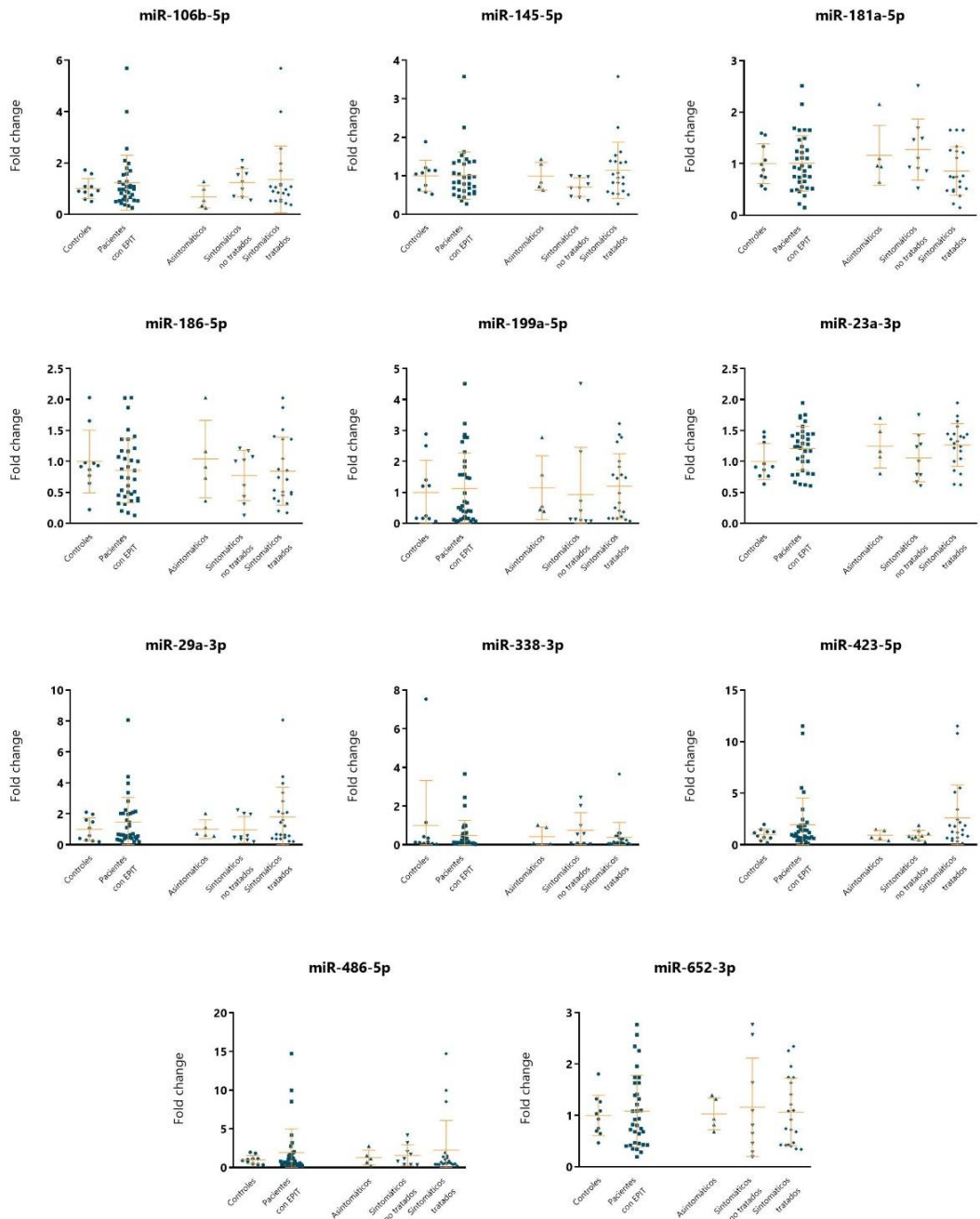


Figura 20. Comparativa de los niveles de expresión sérica de los miRNAs incluidos en la etapa de validación. Los datos representados corresponden al valor de *Fold change* y se representan como media \pm DE.

Finalmente, decidimos estudiar si el tratamiento con TRE era un condicionante que modificaba los niveles séricos de dystromiRs (miR-1-3p, miR-133a-3p y miR-206). Estudiamos muestras de tres pacientes que se obtuvieron antes del inicio del tratamiento y entre 6 meses y 1 año después. En la **Figura 21** se puede observar que los niveles séricos de dystromiRs aumentaron en dos pacientes mientras que disminuyeron en uno de los pacientes. Sin embargo, no aplicamos ningún estudio estadístico debido al pequeño tamaño de nuestra cohorte.

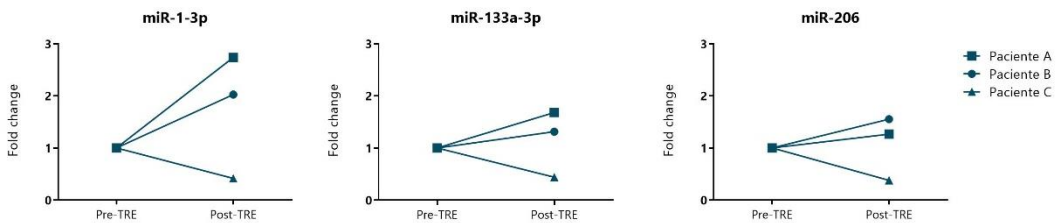


Figura 21. Comparativa de los niveles de expresión sérica de los miRNAs incluidos en la etapa de validación. Los datos representados corresponden al valor de *Fold change*.

5.1.3. Expresión de miRNAs en músculo

Con respecto a la expresión de miRNAs en músculo, se puede observar un aumento estadísticamente significativo en la concentración de miR-206 en biopsias musculares de pacientes con EPIT extraídas antes del inicio del tratamiento (n=4) en comparación con los controles (n=5) (**Figura 22C**). Aunque las diferencias observadas en la expresión muscular de miR-1-3p y miR-133a-3p no fueron estadísticamente significativas, hubo una tendencia a estar más elevados en los pacientes en comparación con los controles (**Figura 22A y B**).

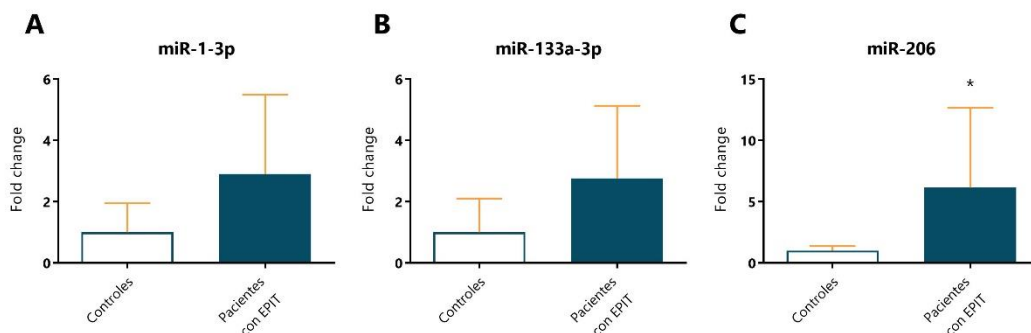


Figura 22. Comparativa de los niveles de expresión muscular de los miRNAs incluidos en la etapa de validación. Los datos representados corresponden al valor de *Fold change* y se representan como media \pm DE. * $p < 0.05$

5.1.4. Correlación entre las pruebas clínicas y la expresión de miRNAs en suero

Al realizar estudios de correlación entre la expresión de los diferentes miRNAs, los resultados mostraron una correlación estadísticamente significativa entre los niveles séricos de miR-1-3p, miR-133a-3p y miR-206a en pacientes con EPIT (**Tabla 5**).

También se realizaron correlaciones entre los niveles séricos de dystromiRs y las características clínicas de los pacientes. Los resultados obtenidos mostraron que no había ninguna correlación entre la edad de los pacientes, la edad al inicio de la TRE, el tiempo en el inicio de la ERT y los niveles séricos de miRNAs. En cambio, se identificaron correlaciones significativas entre los niveles de expresión de dystromiRs y algunas de las pruebas de función muscular (**Tabla 5**), a pesar de obtener coeficientes de correlación inferiores a 0.6.

Con respecto a la fracción de grasa media de los muslos, analizada mediante RM muscular cuantitativa, en la misma tabla podemos ver que esta variable correlaciona

con los niveles de expresión sérica del miR-206, aunque al igual que con las pruebas de función muscular, el coeficiente de correlación fue inferior a 0.6.

	miR-1-3p		miR-133a-3p		miR-206	
	Sig	CC	Sig	CC	Sig	CC
miR-1-3p	-	-	0.007	0.457**	0.000	0.761**
miR-133a-3p	0.007	0.457**	-	-	0.003	0.493**
miR-206	0.000	0.761**	0.003	0.493**	-	-
MRC score	0.089	-	0.094	-	0.035	-0.385*
Escala miometría	0.899	-	0.803	-	0.337	-
6MWT	0.803	-	0.073	-	0.584	-
10MWT	0.514	-	0.043	0.378*	0.151	-
Tiempo para levantar y andar	0.446	-	0.061	-	0.589	-
Tiempo para subir 4 escalones	0.386	-	0.053	-	0.119	-
Tiempo para bajar 4 escalones	0.855	-	0.120	-	0.211	-
MFM-20	0.388	-	0.039	-0.373*	0.064	-
CVF sentado	0.465	-	0.025	-0.416*	0.243	-
CVF acostado	0.286	-	0.057	-	0.535	-
Escala ACTIVLIM	0.628	-	0.986	-	0.462	-
qMRI fracción grasa	0.107	-	0.205	-	0.013	0.420*

Tabla 5. Correlaciones entre expresión de miRNAs y características clínicas. Sig = significancia bilateral, CC = coeficiente de correlación, *p<0.05 y **p<0.01 (prueba Rho de Spearman).

5.2. Estudio de los mecanismos de atrofia muscular en la EP

5.2.1. Descripción de la cohorte de pacientes

En el estudio se incluyeron muestras de biopsias y células musculares de pacientes con EPIT. En el caso de las muestras de tejido muscular, la **Tabla 7** muestra la siguiente información de los pacientes: tipo de músculo, el sexo, la edad de inicio de síntomas y del momento de la biopsia, las características genéticas y el % de fibras vacuoladas en las biopsias. En el caso de las células cultivadas, la información de los pacientes la encontramos en la **Tabla 8**.

5.2.2. Correlación entre la presencia de vacuolas y el tamaño de las fibras musculares

Como hemos podido observar en la **Tabla 7**, el valor promedio obtenido de fibras musculares con vacuolas en el sarcoplasma fue del 10.06%, con valores en un rango del 0 al 38%. En 6 de los 12 pacientes el valor obtenido era inferior al 5%, lo que confirma que en la EPIT la vacuolización, aunque es un hallazgo característico de la enfermedad, puede ocurrir en una minoría de fibras.

Para identificar si existía una correlación entre el tamaño de las fibras y la presencia de vacuolas en el sarcoplasma, se estableció una escala para clasificar las fibras según 5 puntuaciones diferentes, desde 0 (sin vacuolas) hasta 4 (sarcoplasma lleno de vacuolas) (**Figura 17**, en material y métodos). Como se puede observar en la **Figura 23A**, el diámetro medio de las fibras musculares fue un 12,2% menor en las fibras que contenían vacuolas (puntuaciones de 1 a 4) que en las fibras sin vacuolas en su interior (puntuación 0).

Además, se observó una correlación negativa entre la puntuación y el diámetro de las fibras (**Figura 23B**).

Muestra	Músculo	Sexo	Inicio de los síntomas (edad)	Biopsia (edad)	Mutaciones	% Fibras vacuoladas (escala ≥2)
Músculo						
Músculo Pompe 1	Bíceps	H	62	63	GAA c.-32-13T>G GAA c.1657C>T	<1%
Músculo Pompe 2	Deltoides	M	27	46	GAA c.-32-13T>G GAA c.1532C>A	10.74%
Músculo Pompe 3	Bíceps	H	35	41	GAA c.2173C>T GAA c.2173C>T	9.24%
Músculo Pompe 4	N/A	M	48	62	GAA c.-32-13T>G GAA c.236_246delCCACACAGTGC	15.73%
Músculo Pompe 5	Cuádriceps	M	49	56	GAA c.-32-13T>G GAA c.2600_2604delTGCTinsA	<1%
Músculo Pompe 6	Cuádriceps	M	27	31	GAA c.-32-13T>G GAA c.1192dupC	4.19%
Músculo Pompe 7	N/A	H	36	41	GAA c.-32-13T>G GAA c.875A>G (p.Y292C)	<1%
Músculo Pompe 8	Cuádriceps	H	5	37	GAA c.-32-13T>G GAA: exon 20 Deletion	38.75%
Músculo Pompe 9	Cuádriceps	M	20	53	GAA c.-32-13T>G GAA c.1933G>T (p.D645Y)	29.17%
Músculo Pompe 10	Cuádriceps	M	48	59	GAA c.-32-13T>G GAA c.2237G>A (p.W746*)	12.58%
Músculo Pompe 11	Cuádriceps	H	14	48	GAA c.-32-13T>G GAA: c.1432G>A (p.G478R)	<1%
Músculo Pompe 12	Bíceps	M	30	35	GAA c.-32-13T>G GAA c.-32-13T>G	<1%

Tabla 7. Características de los pacientes con EPIT de los cuales se realizaron ensayos en criosecciones de biopsias musculares. M = mujer y H = hombre. N/A = sin información.

Muestra	Músculo	Sexo	Inicio de los síntomas (edad)	Biopsia (edad)	Mutaciones
Células (miotubos)					
Miotubos Pompe 1	Vasto lateral	H	39	55	GAA c.-32-13T>G GAA c.-32-13T>G
Miotubos Pompe 2	Vasto lateral	H	48	62	GAA c.-32-13T>G GAA c.1721T>C
Miotubos Pompe 3	Bíceps braquial	H	28	42	GAA c.-32-13T>G GAA c.1396delG
Miotubos Pompe 4 (=Músculo Pompe 4)	N/A	M	48	62	GAA c.-32-13T>G GAA c.236_246delCCACACAGTGC

Tabla 8. Características de los pacientes con EPIT en el que se han realizado cultivos celulares.

M = mujer y H = hombre. N/A = sin información.

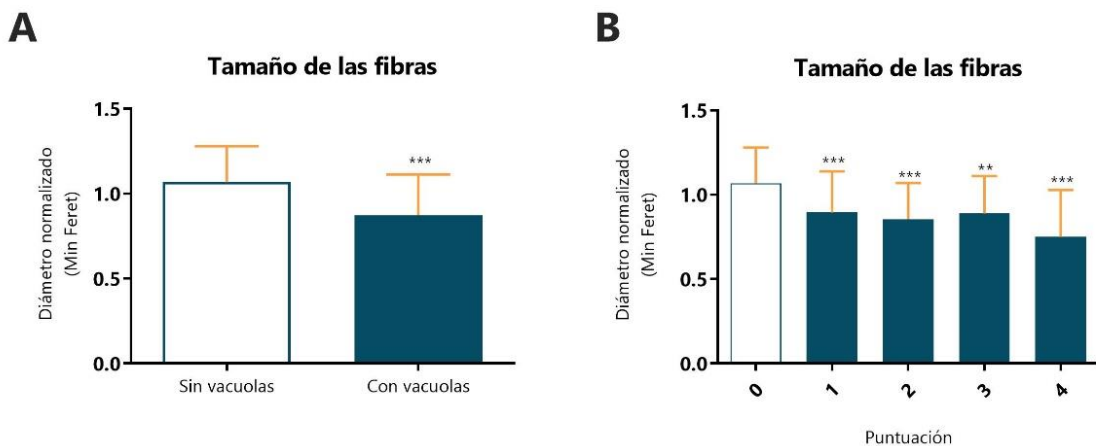


Figura 23. Relación del tamaño de las fibras musculares con la presencia de vacuolas (A) y con la puntuación de éstas (B). Los datos representados corresponden al diámetro de min Feret normalizado y se representan como media ± DE. **p<0.01 y ***p<0.001.

5.2.3. Estudio de los marcadores de atrofia en el músculo de pacientes

5.2.3.1. Expresión de BNIP3 y otros marcadores de atrofia

Se estudió la expresión de varias moléculas relacionadas con la atrofia de las fibras en biopsias musculares de pacientes con EPIT, incluidas Atrogin-1, MuRF-1 y BNIP3.

Más del 90% de las fibras vacuoladas expresaron BNIP3 en pacientes con EPIT, tanto por IHQ (**Figura 24**), como por IF (**Figura 25**).

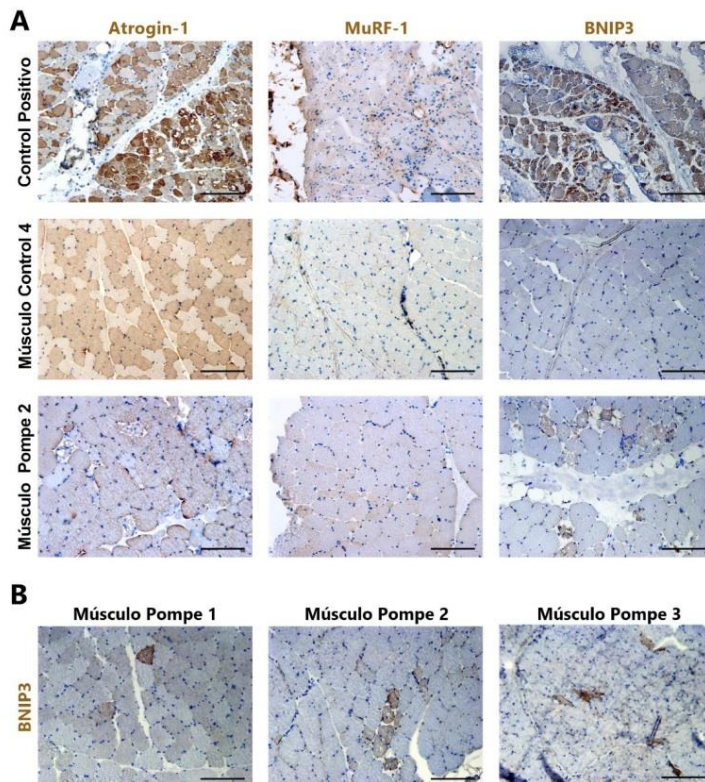


Figura 24. Expresión de Atrogin-1, MuRF-1 y BNIP3 en biopsias musculares de un paciente con DM (control positivo), un control sano y pacientes con EPIT. Barra de escala=200 µm.

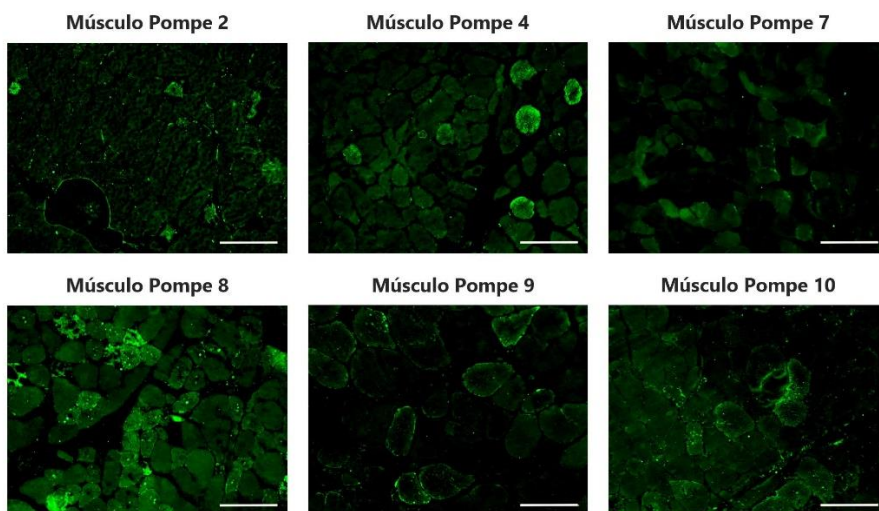


Figura 25. Expresión de BNIP3 en biopsias musculares de pacientes con EPIT. Barra de escala=200 μ m.

En el tejido muscular de pacientes con EPIT no se observaron fibras claramente positivas para Atrogin-1 y MuRF-1 (**Figura 24A**). Sin embargo, la RT-PCR mostró una mayor expresión de mRNA de *FBXO32*, *TRIM63* y *BNIP3* en biopsias musculares de pacientes con EPIT en comparación con los controles, aunque estas diferencias no alcanzaron significación estadística (**Figura 26**).

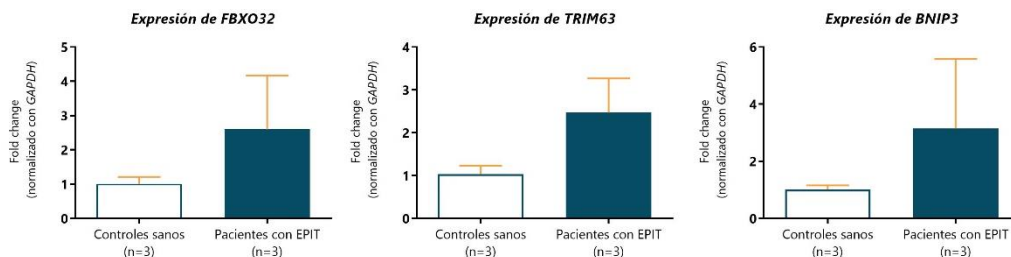


Figura 26. Expresión génica de *FBXO32* (Atrogin-1), *TRIM63* (MuRF-1) y *BNIP3* en músculo de controles sanos y pacientes con EPIT. Los datos representados corresponden al valor de *Fold change* (normalizado con *GAPDH*) y se representan como media \pm DE.

Con el objetivo de relacionar el marcaje de atrofia con la presencia de autofagia en estas fibras, se decidió realizar una IF con doble marcaje para BNIP3 y p62, una proteína involucrada en el proceso de autofagia. Los resultados mostraron que esta proteína se expresaba en fibras musculares positivas para BNIP3, dando un marcaje doblemente positivo (**Figura 27**).

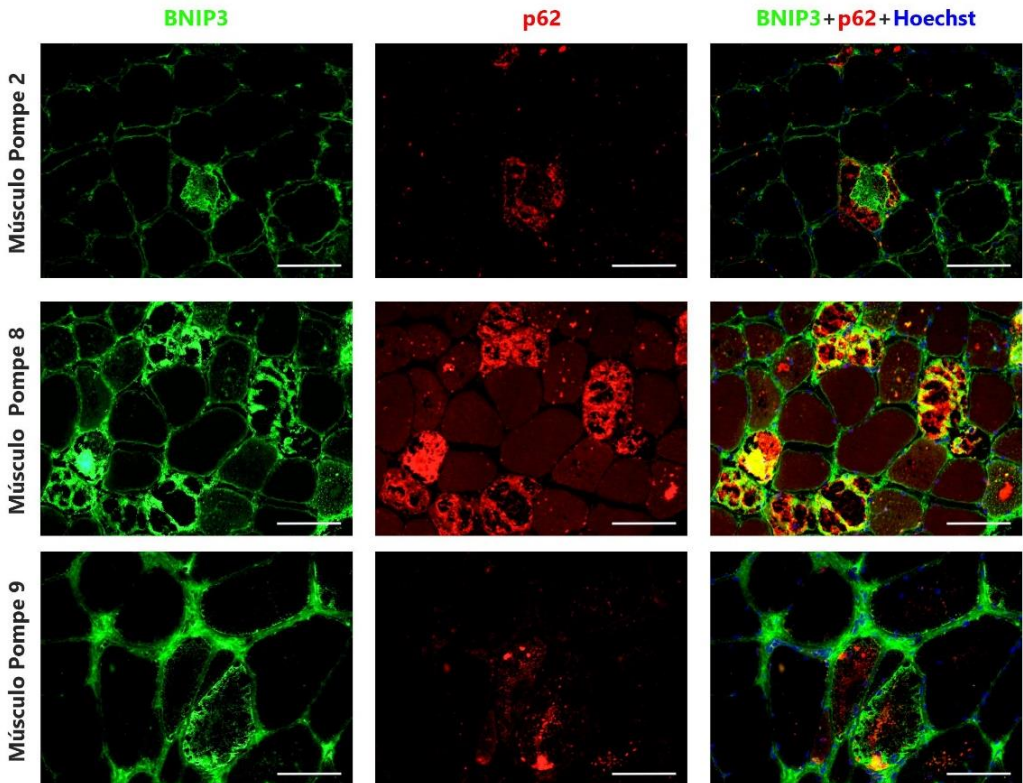


Figura 27. Co-expresión de BNIP3 y p62 en biopsias musculares de pacientes con EPIT. Barra de escala=100 μ m.

El siguiente paso fue estudiar si el marcaje de BNIP3 dependía del tipo de fibras, si eran rápidas o lentas. Como se puede observar en las imágenes de la **Figura 28**, la expresión de BNIP3 no dependía del tipo de fibra ya que se detectó expresión de BNIP3 en ambos tipos de fibras.

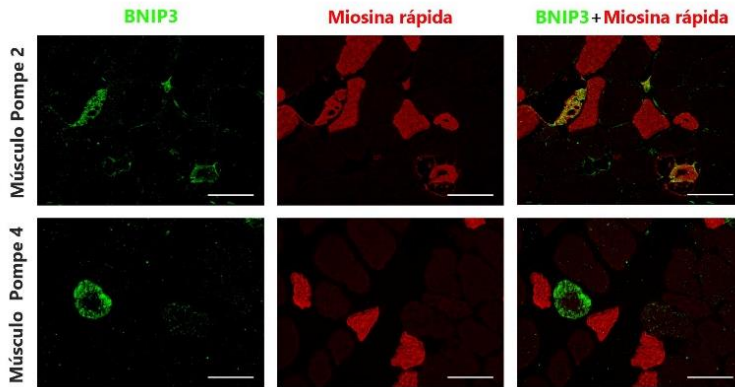


Figura 28. Expresión de BNIP3 y fibras rápidas en biopsias musculares de pacientes con EPIT.

Barra de escala=100 μ m.

Además, como se han observado cambios neurógenos en pacientes con EP y las fibras atroficas podrían ser fibras denervadas, se estudió la expresión de BNIP3 en biopsias musculares de pacientes con neuropatía motora. No obstante, no se observó expresión de BNIP3 en las biopsias de estos pacientes (**Figura 29**).

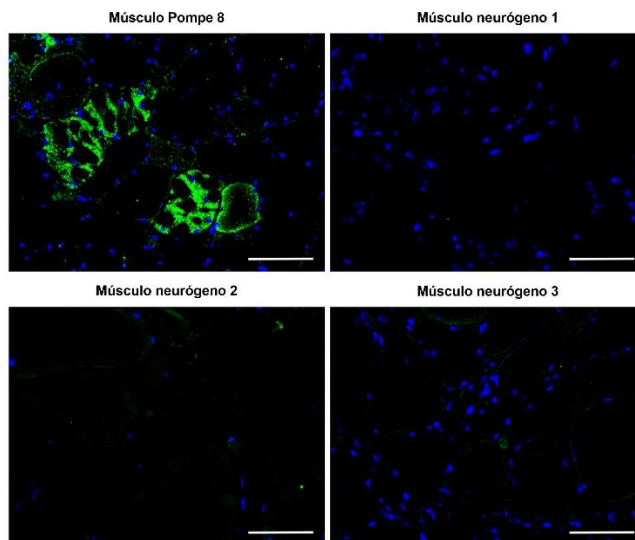


Figura 29. Expresión de BNIP3 en biopsias musculares de pacientes con neuropatía motora.

Barra de escala=100 μ m.

5.2.3.2. Estudio de las vías de regulación de BNIP3

Para caracterizar el papel de BNIP3 en la EP, se estudiaron las vías moleculares que regulan su expresión, tal y como se muestra en el diagrama de la **Figura 30A** basado en Gao et al.⁽¹⁵³⁾ Se ha descrito que la hipoxia, el daño celular y la autofagia regulan la expresión celular de BNIP3.

Para estudiar si se daba un proceso de hipoxia en pacientes con EPIT que desencadenase la expresión de BNIP3, se estudió la expresión del factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1 α). Como control de la IF se utilizó una biopsia de un paciente con DM el cual presentaba un marcaje claramente positivo. Los resultados obtenidos mostraron que aparentemente no se da un proceso de hipoxia en los pacientes con EPIT, ya que éstos no expresaban este factor (**Figura 30B**).

Por otro lado, el daño de la membrana muscular se asocia a un aumento en los niveles de Ca⁺⁺ en el sarcoplasma de las fibras musculares que activan la vía TNF- α /NF- κ B que desencadena la expresión de BNIP3. Es por ello, que se estudió la posible acumulación de Ca⁺⁺ en los pacientes con EPIT. Para ello, las biopsias de pacientes con EPIT se analizaron con un microscopio de luz polarizada y se utilizó la biopsia de un paciente con DMD como controles positivos debido al daño masivo de la membrana celular y la acumulación de Ca⁺⁺ dentro de las fibras musculares. En los pacientes con EPIT, únicamente se observó una acumulación menor en fibras aisladas (**Figura 30C**).

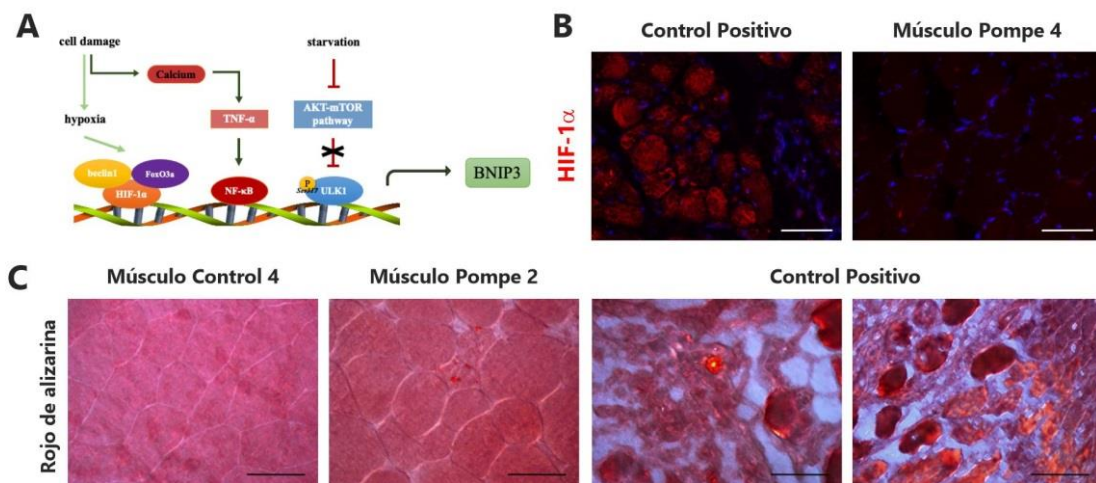


Figura 30. Esquema de las vías moleculares que regulan la expresión de BNIP3 (A). Estudio de procesos de hipoxia en pacientes con EPIT utilizando como control un paciente con DM (B). Estudio de la acumulación de Ca⁺⁺ con rojo de alizarina en pacientes con EPIT usando como control positivo un paciente con DMD (C). Barra de escala=100 μm.

Finalmente, y tal y como se muestra en el diagrama, BNIP3 se encuentra regulado por mTOR en respuesta a la activación de la autofagia. ULK1 es un iniciador clave de la autofagia regulado también por AMPK. La fosforilación de ULK1 en diferentes residuos presenta diferentes consecuencias. Por un lado, mTOR inhibe ULK1 a través de la fosforilación del residuo Ser555 y, por otro lado, la inhibición de mTOR permite la interacción de ULK1 y AMPK. En ésta, AMPK fosforila el residuo Ser317 de ULK1 activándolo e induciendo la expresión de proteínas implicadas en la autofagia. Dado que está publicado que mTOR se encuentra regulado a la baja en la EP⁽¹⁵⁴⁻¹⁵⁶⁾, se decidió estudiar en pacientes con EPIT la expresión de AMPK y la fosforilación del residuo Ser317 de ULK1.

Los resultados mostrados en la **Figura 31** revelaron que las biopsias musculares de los pacientes con EPIT presentaban fibras positivas para ULK1-p. Además, la IF doble con

anticuerpos BNIP3 y ULK1-p (Ser317) mostró que del total de fibras positivas para BNIP3 una media del 87.37 % (rango de 55 a 100%) co-expresaban ULK1-p (Ser317).

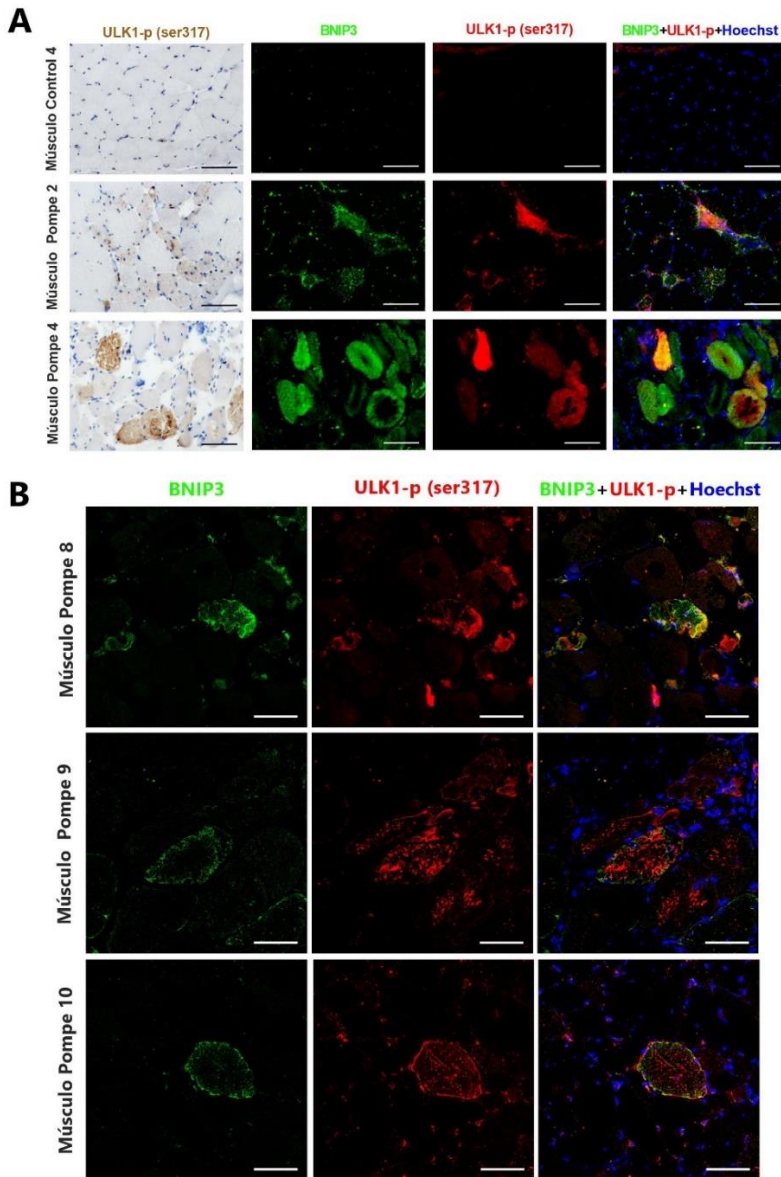


Figura 31. Co-expresión de BNIP3 y ULK1-p en biopsias musculares de pacientes con EPIT. Barra de escala=100 μ m (A) y 75 μ m (B).

Finalmente se pudo relacionar la activación de ULK1 mediante la vía AMPK ya que las fibras positivas para BNIP3 co-expresaron con AMPK-p (Thr172), tal y como se muestra en la **Figura 32**.

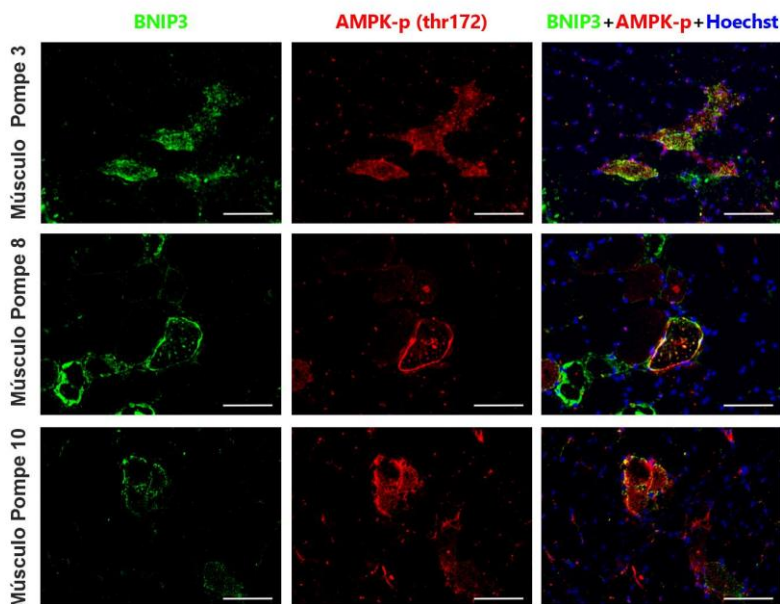


Figura 32. Co-expresión de BNIP3 y AMPK-p en biopsias musculares de pacientes con EPIT.
Barra de escala=100 μ m.

5.2.3.3. Estudio de las funciones principales de BNIP3

BNIP3 tiene un papel destacado en la autofagia, la atrofia celular y la apoptosis (**Figura 33**)⁽¹⁵³⁾.

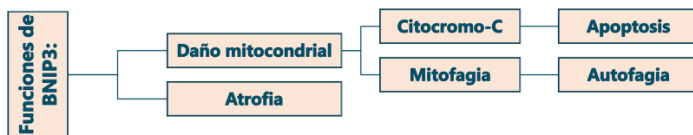


Figura 33. Esquema de las principales funciones que ejerce BNIP3.

Como se mencionó anteriormente, se ha observado que el acúmulo de vacuolas en el sarcoplasma de las fibras musculares está asociado con la atrofia de la fibra muscular que podría estar dirigida por la expresión de BNIP3, entre otras moléculas proatróficas. Sin embargo, BNIP3 también puede inducir la apoptosis a través del daño mitocondrial. Estudios previos confirman que BNIP3 induce la permeabilización de la membrana mitocondrial y la liberación de citocromo-C al citosol, lo que desencadena la muerte celular programada.^(157,158) Sin embargo, en nuestro estudio no observamos que sea ésta una de las funciones que desempeña BNIP3 en los pacientes con EPIT, ya que no se encontró expresión de citocromo-C en el sarcoplasma de las biopsias de músculo (**Figura 34B**). Además, no se observó marcaje de DNA en las biopsias musculares de pacientes con EPIT con la técnica de TUNEL, lo que confirma que no se produce apoptosis en estos pacientes (**Figura 34A**).

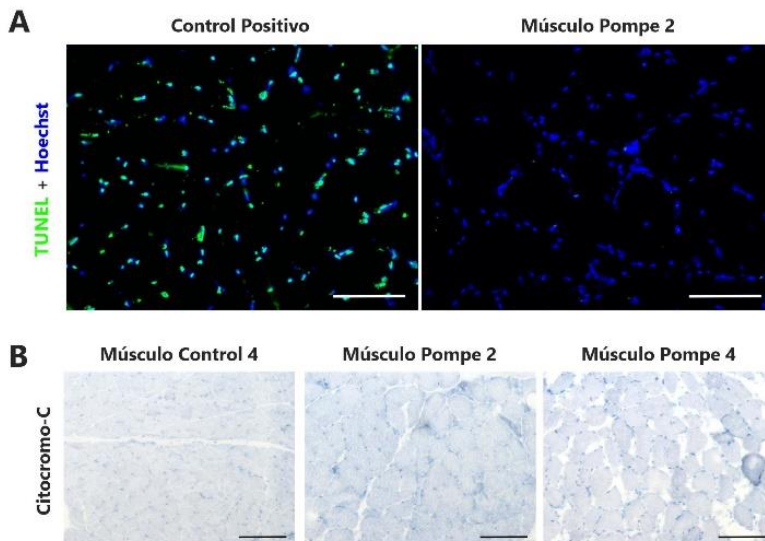


Figura 34. Estudio de muerte celular en biopsias musculares de pacientes con EPIT utilizando el kit de TUNEL (A) y analizando la expresión de citocromo C (B). Barra de escala=200 (A) μm y 100 μm (B).

Como BNIP3 también ha estado involucrado en el proceso de mitofagia, analizamos si FUNDC1 también se expresaba en fibras musculares positivas para BNIP3. En los

resultados, se identificaron únicamente unas pocas fibras positivas para FUNDC1 en los pacientes con EPIT que, además, solo unas pocas co-expresaron con BNIP3 (**Figura 35**), lo que sugiere que ocasionalmente podría ocurrir un proceso activo de mitofagia en las fibras musculares que expresan BNIP3.

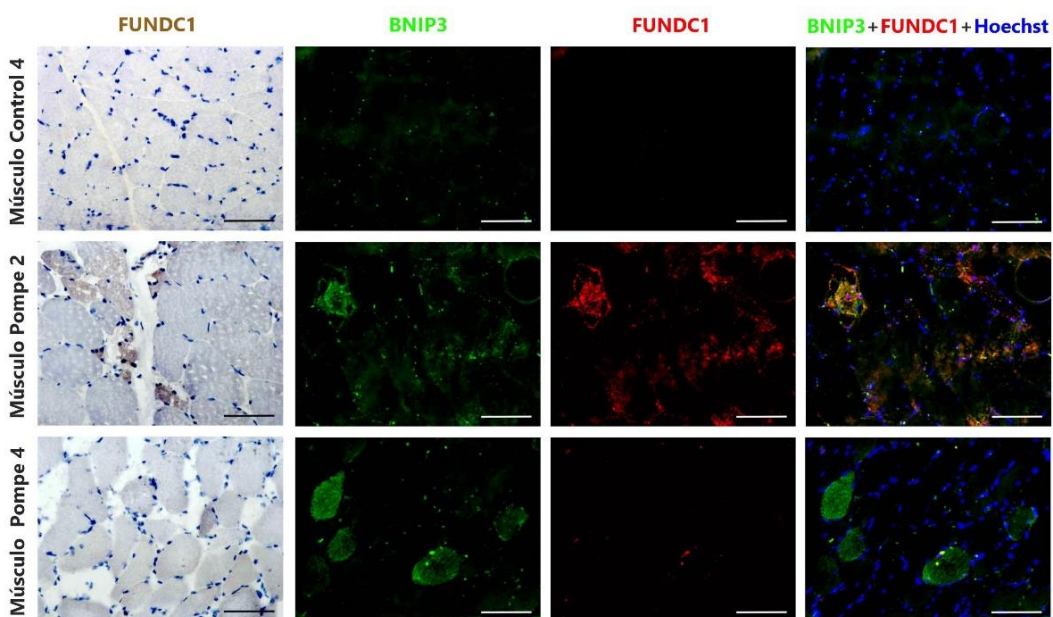


Figura 35. Co-expresión de BNIP3 y FUNDC1 en biopsias musculares de pacientes con EPIT.

Barra de escala=100 μ m.

Estos resultados apoyan la idea de que la principal consecuencia de la sobreexpresión de BNIP3 en pacientes con EPIT es la atrofia de las fibras musculares.

5.2.4. Estudios de atrofia muscular en miotubos de pacientes

En base a los hallazgos observados en biopsias musculares de pacientes con EPIT, se decidió analizar si los mioblastos *in vitro* replicaban, y por lo tanto se afianzaban los resultados obtenidos *in vivo* en la biopsia muscular.

5.2.4.1. Estudios de proliferación y diferenciación

Estudios recientes avalan que los mioblastos de pacientes con EP tienen la capacidad de proliferación y diferenciación intactas.⁽¹⁵⁹⁾ Nuestros experimentos coinciden con éstos, ya que los mioblastos de pacientes con EPIT mostraron tasas de proliferación normales en comparación con los mioblastos de control (**Figura 36**).

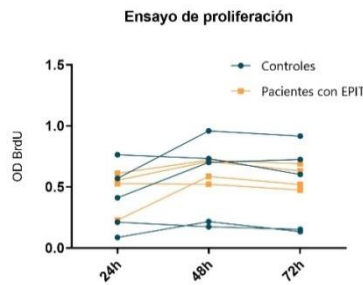


Figura 36. Ensayo de BrdU para evaluar la proliferación celular.

Al inducir la diferenciación, tanto los mioblastos de los controles como los de los pacientes con EPIT activaron el programa miogénico, iniciando una expresión de *MYOG* y posteriormente *MYH1* una vez ya se habían formado los miotubos después de 9 días de diferenciación (**Figura 37**).

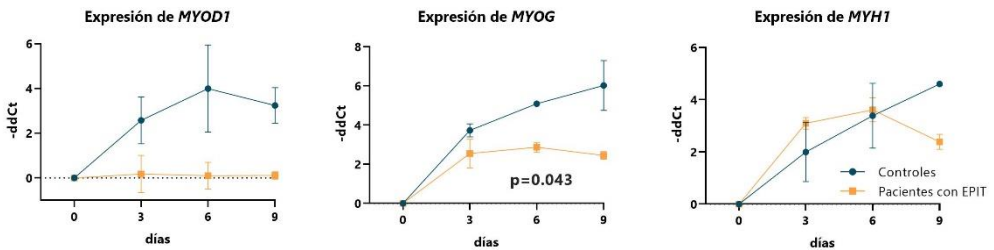


Figura 37. Expresión génica de *MYOD1*, *MYOG* y *MYH1* durante el proceso de diferenciación de los mioblastos a miotubos en controles sanos y pacientes con EPIT. Los datos representados corresponden al valor de -ddCt y se representan como media ± DE.

5.2.4.2. Estudios de atrofia en miotubos de pacientes con EPIT

A pesar de que los mioblastos de pacientes con EPIT no presentaron alteraciones en la capacidad de diferenciar a miotubo, el tamaño de éstos fue significativamente menor que el de los miotubos de controles (**Figura 38**). El diámetro medio de los miotubos de pacientes con EPIT era de $60.28 \pm 45.55 \mu\text{m}$ frente a el diámetro medio de $91.46 \pm 77.38 \mu\text{m}$ de los controles.

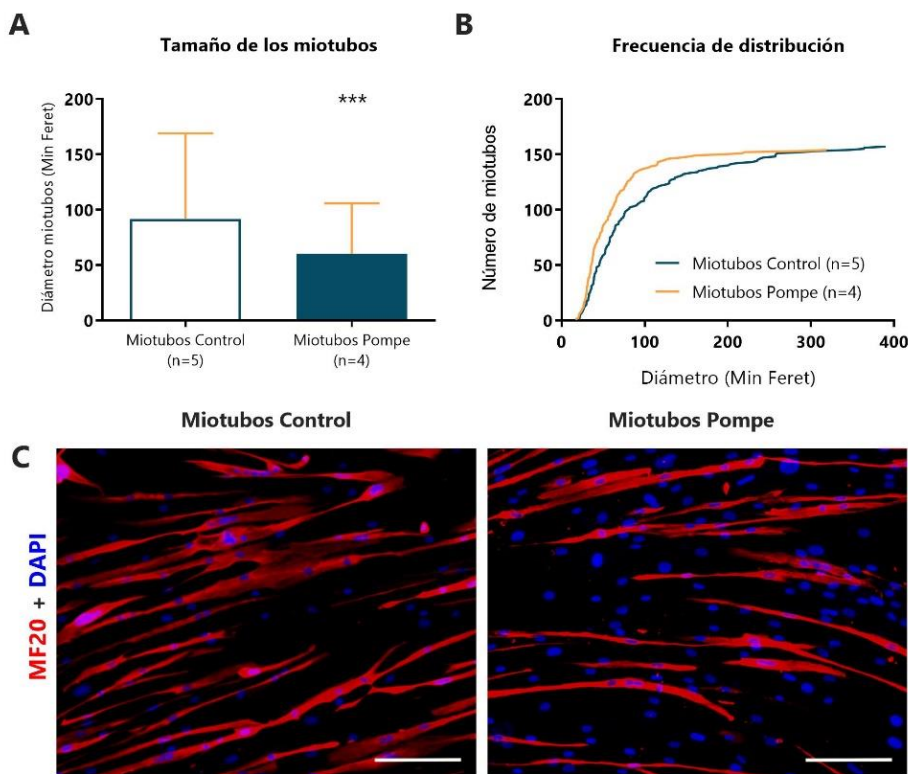


Figura 38. Tamaño del diámetro de los miotubos de controles y de pacientes con EPIT. Los datos representados corresponden al diámetro Min Feret como media \pm DE (A) y como frecuencia de distribución acumulada (B) de imágenes tomadas en ambas cohortes (C). Barra de escala=200 μm . *** $p < 0.001$.

Nos preguntamos si estas diferencias estaban relacionadas con una capacidad de fusión deteriorada de los mioblastos para formar grandes miotubos multinucleados, o si estaban relacionadas con un proceso atrófico en curso, que imitaba lo que sucedía en las fibras musculares. La **Figura 39** muestra que no se encontraron diferencias en el número de núcleos por miotubo entre pacientes con EPIT en comparación con los controles sanos, lo que sugiere que los mioblastos no tenían una capacidad de fusión deficiente.

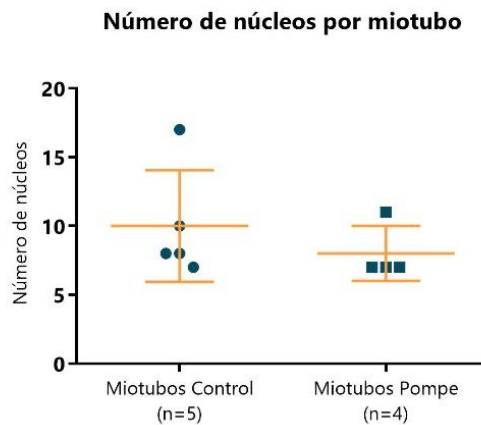


Figura 39. Número de núcleos por miotubos en controles y en pacientes con EPIT. Cada uno de los valores representados es la media obtenida del análisis de los miotubos de cada muestra independiente. Los datos se representan como media \pm DE.

Posteriormente, decidimos evaluar qué genes y proteínas se estaban expresando en estos miotubos. En los resultados obtenidos se mostró un aumento en la expresión del gen *BNIP3* en los miotubos de pacientes con EPIT, aunque estas diferencias no alcanzaron significación estadística (**Figura 40A y B**). Además, observamos un aumento en la expresión de p62 y LC3II/LC3I en las muestras de pacientes con EPIT (**Figura 40C y D**), lo que sugiere que la autofagia se activó en estas células, tal y como se conocía con anterioridad.^(160–162)

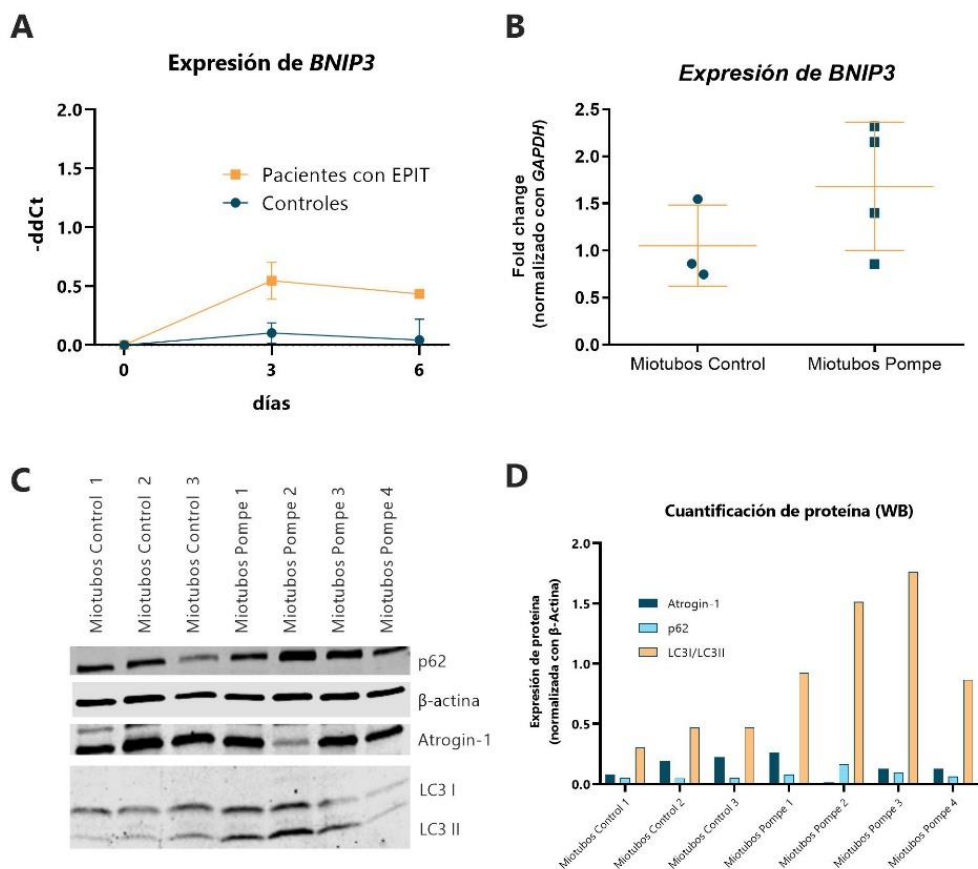


Figura 40. Expresión génica de BNIP3 durante la diferenciación (A) y en la completa formación (B) de miotubos de controles y de pacientes con EPIT. Los datos representados corresponden al valor de $-ddCt$ y *Fold change*, respectivamente, y se representan como media \pm DE. Las imágenes C y D representan la expresión de proteína analizada por WB en los miotubos de controles y pacientes con EPIT. Los datos están normalizados con β -actina.

Todos estos resultados sugirieron que el proceso de atrofia de los miotubos de pacientes con EPIT podría ser inducido por varios factores, y no solo por la expresión de BNIP3.

5.2.4.3. Efectos en la formación de miotubos derivados de la transfección de BNIP3 en mioblastos inmortalizados

Para probar las consecuencias de una sobreexpresión aislada de *BNIP3* en miotubos, se transfectaron mioblastos control inmortalizados con un plásmido *BNIP3* y analizamos su efecto sobre la diferenciación y formación de miotubos. También evaluamos el efecto de transfectar mioblastos con un plásmido control *GFP*, con la finalidad de descartar que los resultados se deban al proceso de transfección y no a la sobreexpresión de *BNIP3*.

Los resultados mostrados en la **Figura 41A** evidencian diferencias significativas en el tamaño de los miotubos entre muestras transfectadas (plásmidos *BNIP3* y *GFP*) y no transfectadas. Sin embargo, los miotubos transfectados con *BNIP3* eran significativamente más pequeños que los transfectados con el plásmido *GFP*, lo que sugiere que la sobreexpresión de *BNIP3* indujo la atrofia de los miotubos.

Además, se observaron diferencias significativas en el índice de fusión entre el grupo de miotubos no transfectados y los grupos transfectados (tanto *GFP* como *BNIP3*), pero no se encontraron diferencias significativas entre las células transfectadas con *GFP* y *BNIP3* (**Figura 41B**). Estos resultados sugieren que el proceso de transfección redujo el índice de fusión, en cambio no se relacionó una sobreexpresión de *BNIP3* con una capacidad de fusión menor.

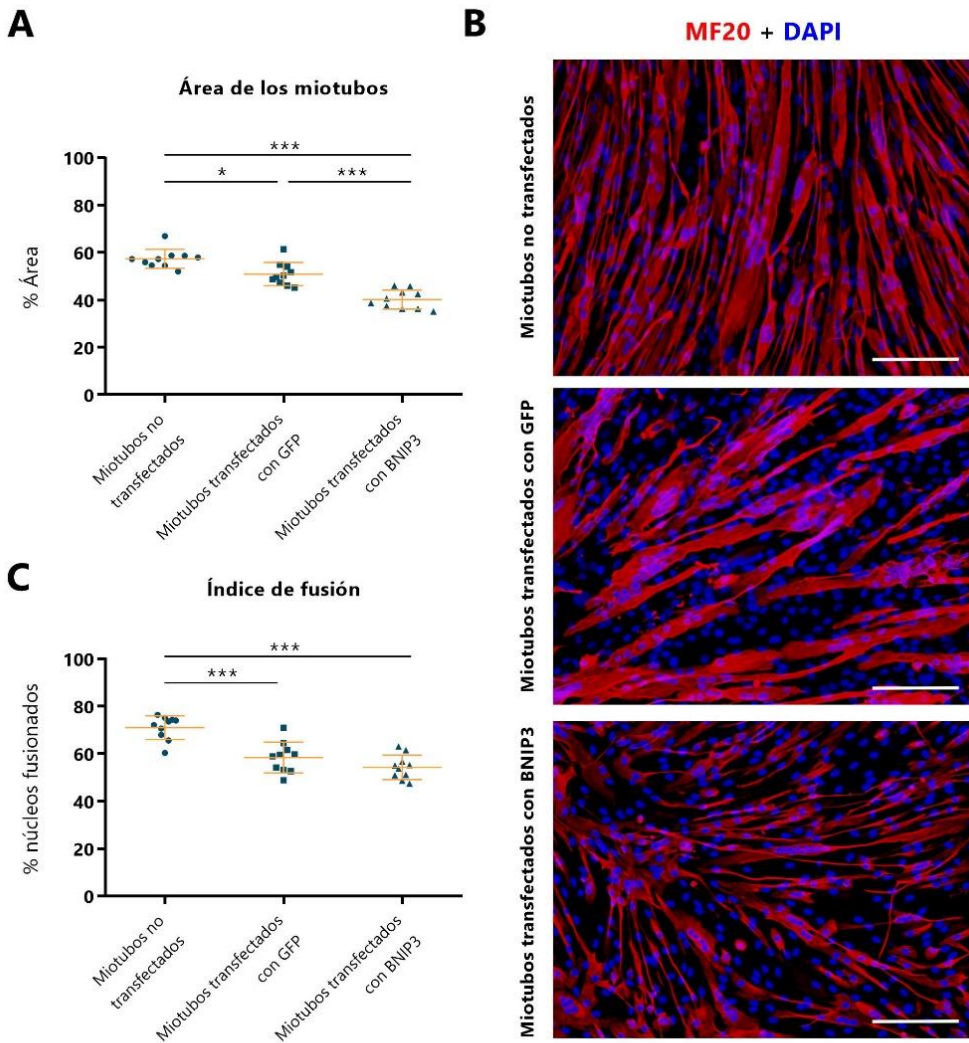
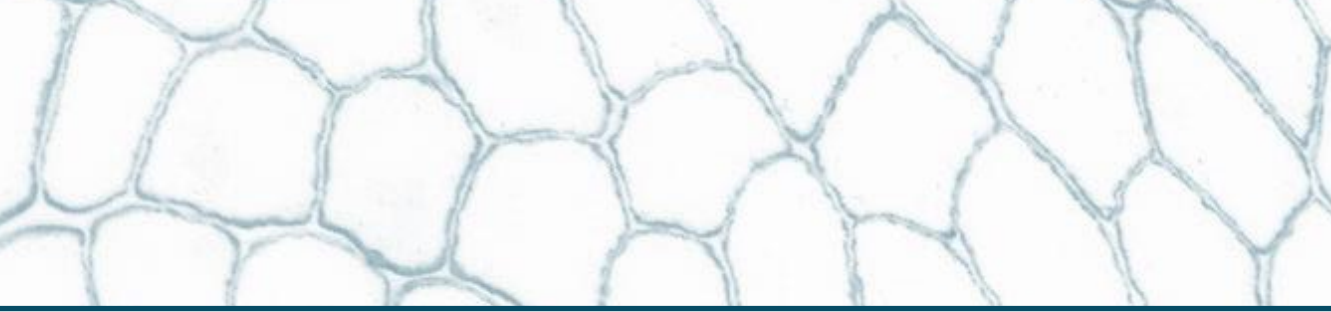
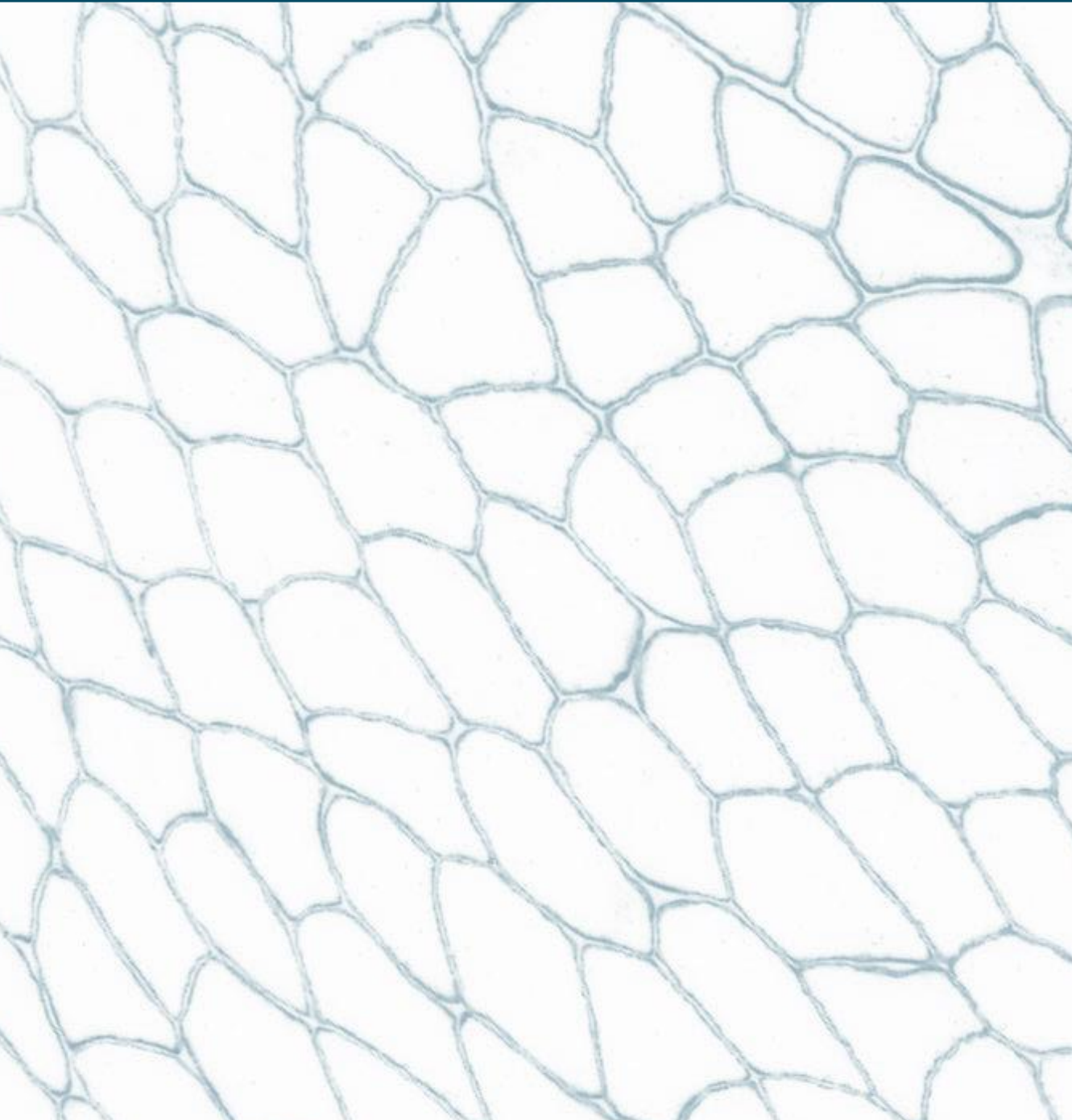


Figura 41. Área (A) e índice de fusión (B) de miotubos inmortalizados no transfectados, transfectados con GFP y transfectados con BNIP3. Los datos están representados como media \pm DE de valores obtenidos de imágenes tomadas en las 3 cohortes (B). Barra de escala=200 μ m.

* $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$.



6. DISCUSIÓN



En la presente tesis se ha realizado, por un lado, el estudio de la expresión sérica de miRNAs en pacientes con EP y su papel como posibles biomarcadores y, por otro lado, el estudio de la fisiopatología de los pacientes con dicha enfermedad, concretamente el proceso de atrofia de las fibras musculares de los pacientes.

En el **primer estudio**, evaluamos la expresión de 190 miRNAs en pacientes con EPIT y controles sanos. Los resultados mostraron que los pacientes presentaban niveles elevados en la expresión de 3 miRNAs: miR-1-3p, miR-133a-3p y miR-206. Las diferencias se consolidaron cuando la comparación de los niveles séricos se realizó entre los pacientes sintomáticos contra los controles sanos. Además, los niveles séricos de miR-206 fueron más elevados en los pacientes sintomáticos en comparación con los asintomáticos, sugiriendo la posibilidad de que estos tres miRNAs podrían ser un biomarcador válido en la progresión de la enfermedad. Sin embargo, identificamos correlaciones débiles entre las pruebas de función muscular y los niveles séricos de este miRNA.

Durante estos últimos años, varios estudios han demostrado que los miRNAs son biomarcadores potenciales de diferentes enfermedades, como el cáncer, el daño hepático o la insuficiencia cardíaca.^(163–165) También se ha estudiado el perfil de expresión de los miRNAs en diferentes enfermedades musculares como la DMD, la distrofia miotónica y la distrofia muscular facioescapulohumeral.^(127,166–169) En dichos estudios, el patrón de expresión de los miRNAs difiere en varios de ellos en comparación con los controles. Tres de ellos, miR-1-3p, miR-133a-3p y miR-206, se encuentran reiteradamente elevados en las distrofias musculares, razón por la cual son conocidos con el nombre de dystromiRs. Éstos sólo se expresan en el corazón y el ME y, por ello, pueden ser una herramienta potencialmente valiosa para el seguimiento de los pacientes en estudios longitudinales, pero también para el estudio de la fisiopatología de las enfermedades musculares.

La implicación de los dystromiRs en el proceso de degeneración y regeneración muscular ha sido ampliamente estudiada. Mientras que el miR-133a-3p influye en la

proliferación de mioblastos, el miR-1-3p y el miR-206 promueven la diferenciación de los mioblastos hacia miotubos. Además, la expresión de estos miRNAs se encuentra regulada por factores de transcripción involucrados en el desarrollo muscular, así como MyoD, Myf5, MEF2, SRF y otros.^(133,170)

Hoy en día, el proceso de degeneración muscular en la EP no se conoce del todo. La expresión reducida de GAA conduce a la acumulación progresiva de glucógeno dentro de los lisosomas de las fibras musculares, lo que provoca la interrupción del proceso de autofagia y, por ende, encontramos lisosomas cargados de glucógeno y vesículas autofágicas en el sarcoplasma. Es por ello, que las propiedades contráctiles características de las fibras musculares se encuentran alteradas. Finalmente, estas fibras musculares mueren y son reemplazadas por grasa y tejido fibroso, proceso similar al que sucede en las distrofias musculares. Todo ello provoca que sea razonable encontrar niveles séricos elevados de dystromiRs en los pacientes con EPIT, como sucede en el suero de los pacientes con distrofias musculares. Este hecho, refuerza la idea de que la EP y las distrofias musculares pueden compartir un proceso fisiopatológico de degeneración muscular.

La relación de los dystromiRs con el proceso de degeneración y regeneración muscular hace que exista una alta probabilidad de que éstos se encuentren elevados en enfermedades musculares, especialmente en el suero de aquellos pacientes en los que el proceso de degeneración y regeneración muscular se encuentra activo. Los resultados obtenidos en nuestro estudio respaldan esta relación, ya que los pacientes sintomáticos que tienen activo este proceso presentaron niveles séricos más elevados de miR-206 en comparación con los pacientes asintomáticos. Es por ello, como se comenta con anterioridad, que los niveles séricos de este dystromiR podrían tener un papel importante como biomarcador para el seguimiento de pacientes con EP. Poder analizar estos niveles a lo largo de los años nos podría permitir identificar el inicio de la degeneración muscular y, por lo tanto, el riesgo de que empiecen a desarrollar síntomas de debilidad muscular.

En el caso del estudio diferencial entre pacientes sintomáticos que han iniciado o no el tratamiento, no encontramos diferencias en los niveles séricos de dystromiRs. No obstante, se debería analizar un mayor número de pacientes para poder extraer conclusiones sobre el efecto de la TRE en el proceso de degeneración y regeneración muscular en la EP sintomática.

Estudios anteriores demostraron que la TRE disminuye la acumulación de glucógeno en las fibras musculares de modelos animales en etapas preclínicas además de en pacientes. No obstante, estudios recientes demuestran que la debilidad muscular de los pacientes con EPIT que están en tratamiento progresa independientemente de éste. Además, la reposición de grasa muscular, que está relacionada con el proceso de degeneración y regeneración muscular, aumenta con los años.^(94,103)

Nuestros resultados avalan la idea de que el proceso de degeneración muscular permanece activo a pesar del inicio del tratamiento en los pacientes con EP. Es por todo ello que sea razonable que no hayamos encontrado una reducción de los niveles de expresión de dystromiRs en las muestras recogidas de pacientes después del tratamiento con respecto a las recogidas previamente a éste.

En un estudio previo al nuestro, Tarallo *et al* estudiaron el perfil de miRNAs en la EP y observaron niveles sanguíneos elevados en la expresión de miR-133-3p tanto en pacientes con EPIT como con EPI.⁽¹⁷¹⁾ Estos resultados y los encontrados en nuestro estudio coinciden, lo cual se hace aún más consistente la idea de que los dystromiRs podrían ser biomarcadores potenciales en la EP.

Con el tiempo se han ido describiendo otros miRNAs implicados en la homeostasis del ME, tanto en personas sanas como en pacientes con alguna enfermedad muscular, éstos son los encargados de regular la miogénesis, la atrofia muscular o los cambios metabólicos y estructurales relacionados con el ejercicio o el envejecimiento.⁽¹⁵²⁾ Entre todos ellos se incluyen: miR-23a, miR-29, miR-146a, miR-486 y miR-181, todos ellos incluidos entre los 190 miRNAs estudiados en en este trabajo, pero no encontramos

diferencias significativas entre los pacientes con EPIT y los controles sanos. Sin embargo, a pesar de que nuestra cohorte incluyera a 35 pacientes, es posible que se necesite un mayor número de muestras para identificar cambios sutiles en la expresión de miRNAs en suero. Es por ello, que la expresión de miRNAs en biopsia muscular debería mostrar mayores diferencias las cuales en suero quedarían enmascaradas.

Una parte de nuestro estudio se centró en analizar la expresión de miRNAs en las biopsias de los pacientes con EPIT, de manera que sería de esperar encontrar diferencias más destacables entre pacientes y controles sanos que las halladas en el suero de los pacientes. No obstante, uno de los grandes problemas que nos encontramos fue la disponibilidad de biopsias musculares de manera que la cohorte de estas muestras fue notablemente inferior, 4 en los pacientes y 5 en los controles sanos. A pesar de ello, confirmamos niveles más elevados de expresión de miR-206 en pacientes con EPIT en comparación con los controles. Aunque los niveles de miR-1-3p y miR-133a-3p aumentaron en las biopsias musculares de pacientes con EPIT, no encontramos diferencias significativas en comparación con los controles, principalmente debido a una alta variabilidad en la expresión de miRNAs. Sin embargo, con estos resultados hallados en la biopsia del ME de los pacientes con EPIT pudimos reafirmar la implicación de estos dystromiRs en la EP.

En resumen, en este primer estudio hemos identificado un grupo de miRNAs con niveles elevados de expresión en muestras de suero de pacientes con EP. El papel de estos miRNAs, denominados dystromiRs, en la degeneración y regeneración muscular sugiere que existe una vía patológica común entre la EP y las distrofias musculares.

Este estudio se publicó en 2019 en la revista *Annals of Clinical and Translational Neurology*, tal y como aparece en el Anexo 1.⁽¹⁷²⁾

El **segundo estudio** de esta tesis doctoral está centrado en analizar la fisiopatología de pacientes con EPIT, concretamente los mecanismos asociados a procesos de atrofia muscular. Los resultados sugirieron que BNIP3 presenta un papel importante en la

autofagia y la atrofia de las fibras musculares en estos pacientes. Con este estudio lo que se pretende es ampliar el conocimiento de las consecuencias moleculares que provoca el déficit de GAA en la EP y, por ende, buscar estrategias terapéuticas para los pacientes que padecen esta enfermedad.

Como ya se ha comentado con anterioridad, la EP es causada por mutaciones en el gen GAA que conduce a una expresión reducida de la enzima GAA que metaboliza el glucógeno a glucosa en el interior de los lisosomas de las células. En consecuencia, hay una acumulación progresiva de glucógeno lisosomal que conduce a una disfunción de toda la función del lisosoma y que, finalmente, provoca una acumulación de vacuolas autofágicas junto con orgánulos defectuosos envejecidos en el sarcoplasma del ME.⁽¹⁷³⁾

Estudios ya publicados relacionan la presencia de fibras musculares atroficas en biopsias de pacientes con EPIT y sugieren que es dependiente de la acumulación de vacuolas autofágicas.⁽¹⁷⁴⁾ En este estudio, observamos una clara correlación entre la cantidad de vacuolas y el tamaño de las fibras musculares, por lo que podemos confirmar la hipótesis anterior. Además, estos hallazgos sugieren que la acumulación autofágica desencadena una cascada molecular intracelular que termina induciendo la atrofia de las fibras musculares.

La atrofia en el ME se encuentra mediada fundamentalmente por la actividad de dos vías altamente conservadas, la vía ubiquitina/proteasoma y la vía autofágica/lisosomal.

En la vía ubiquitina/proteasoma, las proteínas diana se conjugan con restos de ubiquitina y son estas proteínas marcadas las que se degradan dentro del proteasoma. La activación de esta vía se encuentra aumentada en el músculo atrofico debido a la activación transcripcional de la ubiquitina y las ligasas de ubiquitina específicas del músculo, *FBXO32/Atrogin-1* y *TRIM63/MuRF-1*.^(173,175)

En este estudio observamos un ligero aumento en la transcripción de *FBXO32* y *TRIM63* utilizando la RT-PCR y, a su vez, una expresión limitada de las proteínas por la técnica de IF. Estos resultados sugieren que estas dos ligasas pueden no ser los principales

impulsores de la atrofia muscular en la EPIT. Además, hay que tener en cuenta que estas ligasas no siempre se encuentran elevadas en el ME atrófico, por lo que otras ligasas, que no se incluyen en este estudio, podrían desempeñar un papel importante en dicho proceso. A este hecho, se le suma que los niveles de las proteínas Atrogin-1 y MuRF-1 pueden elevarse durante un periodo de tiempo relativamente corto en el inicio del proceso de atrofia y, después, volver a niveles basales.⁽¹⁷⁶⁾ Ésta podría ser una de las razones por las cuales en nuestros resultados no se ve reflejado un claro aumento en la expresión de Atrogin-1 y MuRF-1.

Por otro lado, la vía autofágica/lisosomal es la encargada de engullir porciones de citoplasma y orgánulos celulares en vacuolas que, posteriormente, se fusionan con lisosomas donde el contenido es digerido por hidrolasas lisosomales.⁽¹⁷⁵⁾

La autofagia es una vía fisiológica bien descrita en el ME ya que se ha demostrado la acumulación de vacuolas autofágicas en miopatías metabólicas. En estas enfermedades la etiología radica en la deficiencia de proteínas lisosomales, como son la EP y la enfermedad de Danon, o en la inhibición farmacológica de la función lisosomal en la miopatía por cloroquina.^(177,178)

Los mecanismos que controlan la regulación positiva de la autofagia y los genes lisosomales siguen conociéndose día a día. Se ha demostrado que el factor de transcripción FoxO3 controla la transcripción de algunos genes relacionados con la autofagia, como son *LC3* y *BNIP3*.⁽¹⁷⁹⁾ En nuestro estudio, hemos identificado fibras musculares que expresan BNIP3 en el ME de pacientes con EPIT, aunque el porcentaje de fibras positivas era notablemente variado entre los pacientes analizados. Sin embargo, todas las fibras positivas para BNIP3 estaban vacuoladas y atroficas, lo que sugiere un vínculo entre la expresión de esta molécula, la inducción de la autofagia y la atrofia progresiva de las fibras musculares.

BNIP3 es un miembro de la familia de Bcl-2 formados por factores reguladores de la muerte celular.⁽¹⁸⁰⁾ Las vías moleculares que regulan la expresión de esta proteína se

han estudiado en diferentes tipos celulares y en ellos se conoce que estímulos como el daño celular, la hipoxia, el estrés oxidativo e incluso la inanición pueden inducir a la expresión del gen *BNIP3*.^(153,181) Por esta razón, en este segundo estudio decidimos analizar algunos de estos mecanismos y su relación con la expresión de BNIP3 en las fibras musculares atroficas de los pacientes con EPIT.

Para evaluar el daño celular se decidió estudiar la acumulación intracelular de Ca^{++} en el interior de las fibras musculares, tal y como está descrito en pacientes con DMD.⁽¹⁸²⁾ En esta enfermedad la reducción o ausencia de distrofina debilita la membrana muscular y, por ende, aumenta la probabilidad de que el ME sufra un daño al realizarse la función contráctil. En nuestros resultados, a pesar de observar depósitos de Ca^{++} puntiforme en el interior de las fibras musculares de pacientes con EPIT, no encontramos una gran acumulación de Ca^{++} intracelular en las biopsias musculares de los pacientes en comparación con las de pacientes con DMD. Todo ello podría ser debido a que es dudoso que exista un daño activo de la membrana muscular en la EP.⁽¹⁸³⁾

Otro factor potencial que induce el daño celular es la hipoxia, ya que aumenta los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS) que conducen a la activación de HIF-1 α . Éste, a su vez, se une a FoxO3a formando el complejo HIF-1 α -beclin1-FoxO3a-p que se transloca al núcleo y regula al alza la expresión de BNIP3.⁽¹⁵³⁾ Sin embargo, nuestro estudio no mostró fibras musculares doblemente positivas para BNIP3 y HIF-1 α , por lo que no pudimos relacionar la expresión de éste con un mecanismo de hipoxia.

Finalmente, otro de los mecanismos de estudio fue la inanición, ya que activa la autofagia a través de la inhibición de la vía AKT-mTOR. Con ello, se permite la interacción de ULK1 y AMPK, ya que el complejo ULK1 deja de estar inhibido por el complejo mTORC1. AMPK fosforila el residuo Ser317 de ULK1 activando la expresión de BNIP3.^(153,155) En nuestro estudio, obtuvimos como resultado que el 87.37 % de las fibras positivas para BNIP3 eran también positivas para ULK1-p (Ser317) sugiriendo que

en la EP el proceso de autofagia ya activado, que se sabe que depende de una regulación a la baja de la vía AKT-mTOR, es la causa principal de la sobreexpresión de BNIP3.

Hasta el momento, se han descrito los mecanismos estudiados en esta tesis doctoral que explicarían las causas que provocan una sobreexpresión de BNIP3 en el ME de los pacientes con EPIT. A continuación, se describen las consecuencias que este hecho puede acarrear en el ME de estos mismos pacientes.

La expresión de BNIP3 se ha relacionado con múltiples procesos celulares, incluido el daño mitocondrial que conduce a la muerte celular, la autofagia y la atrofia celular.^(180,184,185)

Existen evidencias que demuestran que BNIP3 es un contribuyente significativo del daño mitocondrial que conduce a la degradación de las mitocondrias a través de un tipo específico de autofagia, conocida como mitofagia y apoptosis celular.⁽¹⁸⁶⁾ Una vez expresado, BNIP3 se dimeriza y se ubica sobre la membrana mitocondrial abriendo un poro de transición de permeabilidad induciendo, a su vez, hinchazón, pérdida del $\Delta\Psi_m$ y liberación de citocromo-C.^(187,188)

El citocromo-C es uno de los componentes del apoptosoma que se forma en el citoplasma cuando hay daño mitocondrial y, finalmente, desencadena la apoptosis.^(189,190) Sin embargo, en nuestro estudio no se observó aumento de la expresión de citocromo-C en el sarcoplasma de las fibras musculares ni evidencia de una apoptosis activa en las biopsias de pacientes con EPIT. Estos resultados sugieren que la función principal de BNIP3 en la EP no está relacionada con la muerte celular programada.

Por otro lado, la despolarización mitocondrial inducida por BNIP3 generalmente conduce al secuestro de las mitocondrias en autofagosomas para el reciclaje de orgánulos. Este proceso requiere la interacción de varias moléculas diferentes, incluida FUNDC1. En nuestros resultados, encontramos co-expresión de esta proteína solo en

unas pocas fibras musculares que expresan BNIP3. Esto sugiere que podría ocurrir un proceso activo de mitofagia en algunas de las fibras vacuoladas que expresan BNIP3.^(191–193)

Todos estos resultados apuntan hacia un papel principal de BNIP3 en la atrofia de las fibras musculares en los pacientes con EPIT. De hecho, BNIP3 es uno de los atrogenes inducidos en diferentes tipos de desgaste muscular y se ha demostrado que controla la autofagia en otros sistemas celulares. Además, la sobreexpresión de BNIP3 parece ser suficiente para inducir la formación de autofagosomas en el ME normal y conducir a la atrofia de las fibras musculares.

Para poder fortalecer todos nuestros resultados realizados en biopsias musculares de pacientes con EPIT, decidimos trasladar estos estudios al cultivo celular primario de mioblastos de pacientes con EPIT. Nuestros resultados confirmaron que los miotubos, obtenidos a partir de mioblastos, también mostraban un proceso atrófico en curso, siendo de un tamaño inferior a los obtenidos de controles sanos. También, observamos un aumento de la expresión de BNIP3 en los miotubos de pacientes con EPIT, además de un proceso autofágico activo evidenciado por la sobreexpresión de p62 y la relación LC3II/I. Probablemente, ello podría ser la causa de la reducción del tamaño de los miotubos.

Para confirmar que la expresión de BNIP3 en los miotubos induce atrofia, decidimos transfectar, con un plásmido *BNIP3*, mioblastos sanos inmortalizados. Éstos se diferenciaron en miotubos más pequeños en comparación con los miotubos no transfectados o transfectados con un plásmido control.

Curiosamente, en un estudio de proteómica publicado en estos últimos años, se encontró que la expresión de BNIP3 aumentaba en el ME de los pacientes con EPIT antes y, en menor medida, después de iniciar el tratamiento con TRE.⁽¹⁹⁴⁾ Los autores atribuyeron el aumento de BNIP3 en las biopsias musculares al estrés energético que conduce a la activación del eje de señalización p38 β -FoxO-BNIP3. Sin embargo, este

mismo estudio también mostró que las biopsias musculares de pacientes con EP presentan una mayor expresión de AMPK-p, como también observamos en los experimentos realizados en este estudio. Todo ello sugiere que ambas vías podrían contribuir a la regulación positiva de BNIP3.

Adicionalmente, se ha descrito una regulación positiva del mRNA de BNIP3 en otras distrofias musculares de cinturas (LGMD), lo que sugiere que BNIP3 también podría estar involucrado en la fisiopatología de estas enfermedades, mientras que se ha demostrado que está reducido en DMD y LGMD-R9.⁽¹⁹⁵⁻¹⁹⁸⁾

Cabe destacar que el estudio de la fisiopatología de la EPIT en muestras humanas es complicado, debido a la heterogeneidad de la gravedad de los hallazgos patológicos entre diferentes pacientes. En ellos, los cambios histológicos pueden afectar sólo a una pequeña proporción de las fibras musculares, lo que limita el uso de técnicas como WB o RT-PCR porque estas tecnologías a menudo pasan por alto los cambios que ocurren solo en unas pocas fibras. Además, el diagnóstico de la EP ha cambiado por completo en los últimos años. En la actualidad, la mayoría de los pacientes son detectados mediante la cuantificación de la expresión enzimática en prueba de gota seca que conducen a la confirmación directa mediante estudio genético. Con ello, se reduce considerablemente el número de biopsias musculares disponibles para estudios de investigación.

Concretamente, para este estudio, hemos utilizado 12 biopsias musculares de pacientes con EPIT en las que observamos que el número medio de fibras con vacuolización estaba en torno al 10% y muchas de ellas tenían menos del 5% de fibras con vacuolas prominentes. Para desentrañar los mecanismos que conducen a la atrofia de la fibra muscular en esta situación, decidimos utilizar la tinción convencional y la IF para estudiar los cambios moleculares activos en fibras musculares individuales.

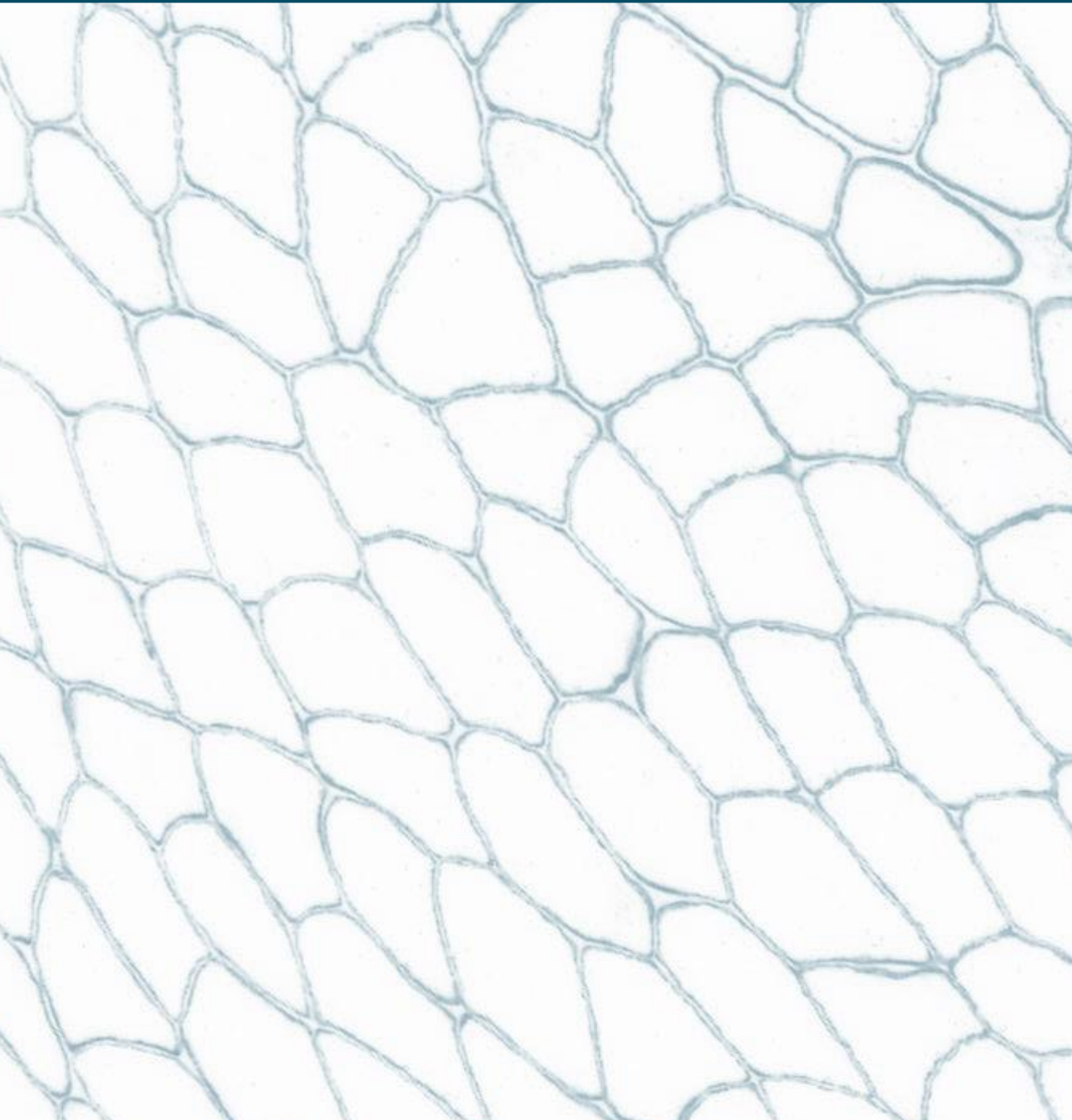
En resumen, en este segundo estudio hemos aportado pruebas convincentes que respaldan el papel de BNIP3 en el proceso de atrofia de las fibras musculares en

pacientes con EPIT. Nuestros datos sugieren que la inhibición de la vía AKT-mTOR activa la expresión de BNIP3, lo que perpetúa la autofagia y probablemente induce la atrofia de las fibras musculares. Estos hallazgos respaldan que una modulación terapéutica de la actividad de BNIP3 podría ser una nueva estrategia terapéutica complementaria y altamente potencial para probar en la EP. En este sentido, recientemente se ha demostrado que el misoprostol, un análogo de la prostaglandina E1, regula la función de BNIP3 en células expuestas a hipoxia reduciendo la apoptosis celular.⁽¹⁹⁹⁾ Además, nuestros resultados avalan experimentos que podrían realizarse adicionalmente para probar si el misoprostol u otros tratamientos similares también podrían ser efectivos para modular la actividad de BNIP3 en las fibras musculares y, por ende, reducir la autofagia y la atrofia en modelos celulares o animales de la EP.

Este segundo estudio ha sido aceptado en la revista *The American Journal of Pathology*, tal y como aparece en el Anexo 2.⁽²⁰⁰⁾

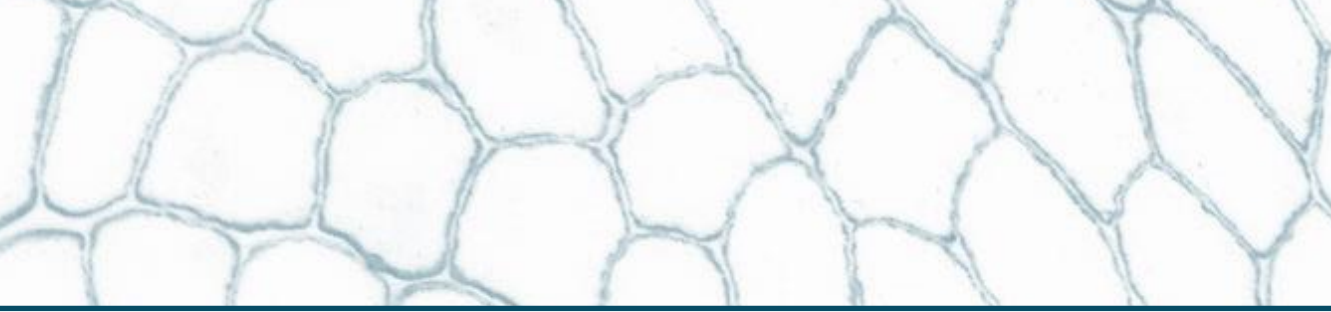


7. CONCLUSIONES

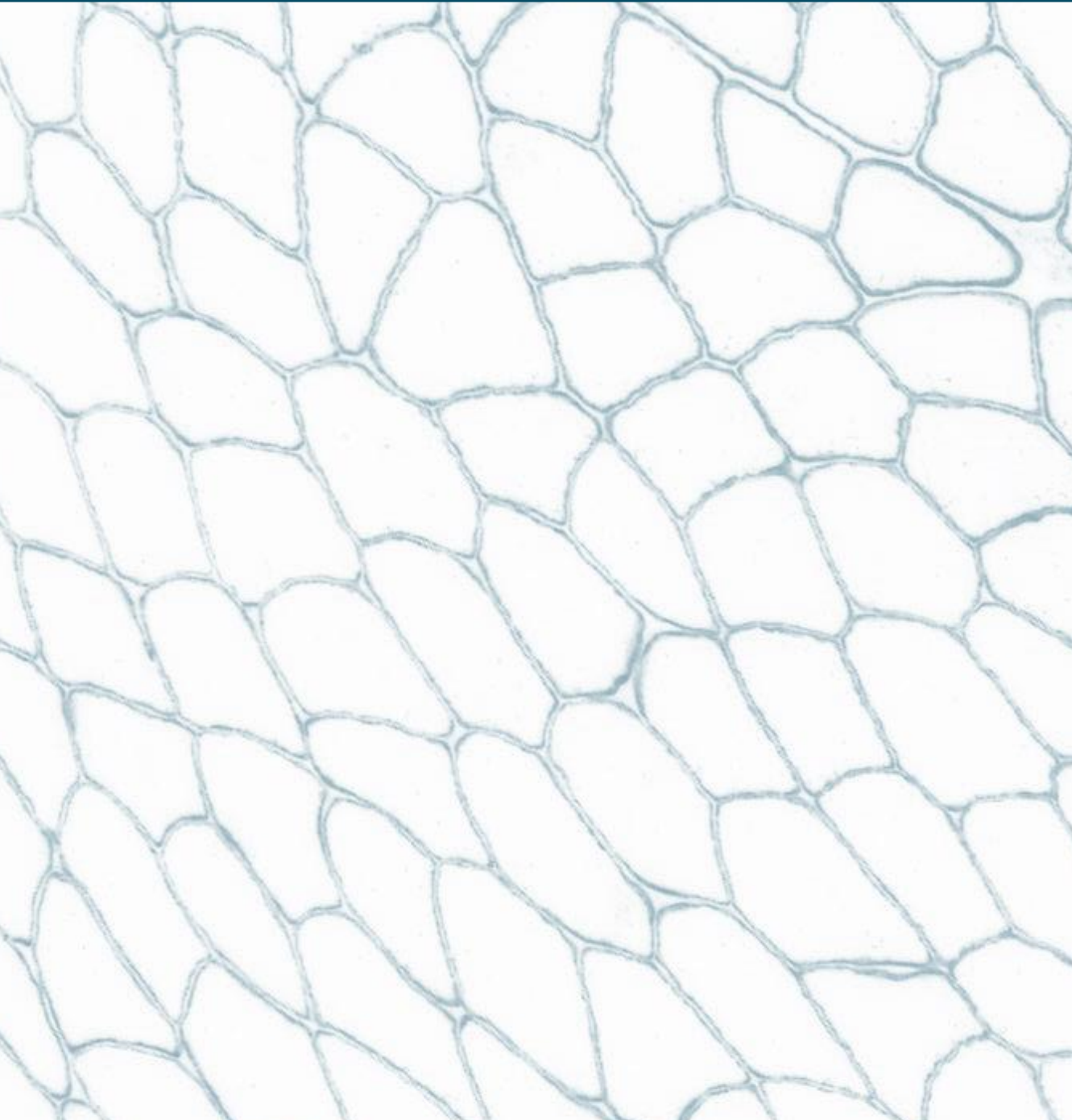


De los estudios realizados en la presente tesis doctoral se extraen las siguientes conclusiones:

- ◆ Los pacientes con EP presentan niveles elevados en sangre de un grupo de miRNAs, denominados dystromiRs, en comparación con los controles sanos.
- ◆ La concentración sanguínea de dichos dystromiRs podría ser un buen biomarcador pronóstico de la enfermedad debido a que correlaciona con las pruebas funcionales musculares y la fracción de grasa identificada mediante RM cuantitativa realizadas a los pacientes con EP.
- ◆ El tamaño de las fibras musculares de pacientes con EP es menor en aquellas que presentan vacuolas en su interior, por lo que se evidencian procesos de atrofia muscular en esta enfermedad. Además, la expresión de BNIP3 en las biopsias musculares de pacientes con EP demuestra la implicación de esta proteína en el proceso atrófico.
- ◆ Los estudios realizados en los cultivos primarios de pacientes con EP confirman la relación de BNIP3 con los procesos de atrofia muscular de la enfermedad.



8. LÍNEAS DE FUTURO



El **primer estudio** descrito en esta tesis doctoral pone de manifiesto la utilidad de los niveles de expresión de dystromiRs en el pronóstico de la enfermedad de Pompe. Una línea futura interesante para seguir sería la realización de un estudio más profundo con un número de muestras más elevado en pacientes con EPIT asintomáticos. Con ello, se podría evaluar la expresión de dystromiRs en una cohorte mayor para verificar las diferencias entre esta cohorte de pacientes y los controles sanos. Esto permitiría monitorizar los niveles de dystromiRs en pacientes asintomáticos, de manera que cuando se elevasen significativamente en un paciente podrían convertirse en indicadores de inicio de tratamiento. Poder controlar estos niveles a lo largo de los años nos podría permitir identificar el inicio de la degeneración muscular y, por lo tanto, el riesgo de que empiecen a desarrollar síntomas de debilidad muscular. Con ello, la TRE podría iniciarse mucho antes de que aparezcan síntomas irreversibles para los pacientes.

Para aumentar la cohorte de asintomáticos, sería interesante poder iniciar estudios en colaboración con diversos hospitales nacionales e internacionales para disponer de un mayor número de muestras.

Por otro lado, el **segundo estudio** de esta tesis doctoral respalda la presencia de mecanismos de atrofia muscular en la EP, además de describir la implicación de BNIP3 en este proceso. Es por ello, que de cara a investigaciones futuras sería interesante poder realizar una modulación terapéutica de la actividad de BNIP3 en la enfermedad como estrategia terapéutica complementaria a las ya existentes.

Como se ha debatido en el apartado de la discusión, recientemente se ha demostrado que el misoprostol, un análogo de la prostaglandina E1, regula la función de BNIP3 en células expuestas a hipoxia reduciendo la apoptosis celular. Sería interesante probar si el misoprostol, u otros tratamientos similares, también podrían ser efectivos para modular la actividad de BNIP3 en las fibras musculares y, por ende, reducir la autofagia y la atrofia en modelos celulares y/o animales de la EP.

Otra línea futura de investigación interesante sería la de **combinar ambos estudios** para determinar si existe correlación entre los niveles de BNIP3 y los de dystromiRs. En caso de encontrar una correlación positiva, se reforzaría la hipótesis de que los niveles de dystromiRs son un indicador del grado de afectación muscular en esta enfermedad.



9. BIBLIOGRAFÍA



1. Frontera WR, Ochala J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Behav Genet.* 2015;45(2):183–95.
2. Glaser J, Suzuki M. Skeletal Muscle Fiber Types in Neuromuscular Diseases. *Muscle Cell Tissue - Curr Status Res F.* 2018;
3. Gillies AR, Lieber RL. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle and Nerve.* 2011;44(3):318–31.
4. Dubowitz V, A Sewry C, Oldfors A. Muscle Biopsy: a Practical Approach. 4th edn. 4th edn. Saunders Elsevier. Cambridge: China; 2013.
5. Exeter D, Connell DA. Skeletal muscle: Functional anatomy and pathophysiology. *Semin Musculoskelet Radiol.* 2010;14(2):97–105.
6. Guyton A, Hall J. Tratado de Fisiología médica 12ª edición. 2011. 1112 p.
7. Kuo IY, Ehrlich BE. Signaling in muscle contraction. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(2).
8. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in Mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev.* 2011;91(4):1447–531.
9. Scott W, Stevens J, Binder–Macleod SA. Human Skeletal Muscle Fiber Type Classifications. *Phys Ther.* 2001;81(11):1810–6.
10. Wang Y, Pessin JE. Mechanisms for fiber-type specificity of skeletal muscle atrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2013;16(3):243–50.
11. Carlson BM. The regeneration of skeletal muscle — a review. *Am J Anat.* 1973;137(2):119–49.
12. Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-Manera J, Messina G, Cossu G. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *J Clin Invest.* 2010;120:11–9.
13. Karalaki M, Fili S, Philippou A, Koutsilieris M. Muscle regeneration: Cellular and molecular events. *In Vivo (Brooklyn).* 2009;23(5):779–96.
14. Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol Rev.* 2004;84(1):209–38.
15. Musarò A. The Basis of Muscle Regeneration. *Adv Biol.* 2014;1–16.
16. Dumont NA, Bentzinger CF, Sincennes MC, Rudnicki MA. Satellite cells and skeletal

- muscle regeneration. *Compr Physiol*. 2015;5(3):1027–59.
17. Tu MK, Borodinsky LN. Spontaneous calcium transients manifest in the regenerating muscle and are necessary for skeletal muscle replenishment. *Cell Calcium*. 2014;56(1):34–41.
 18. Oishi Y, Manabe I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration. *Int Immunol*. 2018;10(2):1–15.
 19. Wang J. Neutrophils in tissue injury and repair. *Cell Tissue Res*. 2018;371(3):531–9.
 20. Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2005;288(2 57-2):345–53.
 21. Tidball JG. Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(3):165–78.
 22. Ciciliot S, Schiaffino S. Regeneration of Mammalian Skeletal Muscle: Basic Mechanisms and Clinical Implications. *Curr Pharm Des*. 2010;16(8):906–14.
 23. Chazaud B, Brigitte M, Yacoub-Youssef H, Arnold L, Gherardi R, Sonnet C, et al. Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration. *Exerc Sport Sci Rev*. 2009;37(1):18–22.
 24. Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. *Immunity*. 2016;44:450–60.
 25. Heredia JE, Mukundan L, Chen FM, Mueller AA, Deo R, Locksley RM, et al. Type 2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration. *Cell*. 2013;153(2):376–88.
 26. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol*. 1961;9:493–5.
 27. Gibson MC, Schultz E. Age-related differences in absolute numbers of skeletal muscle satellite cells. *Muscle and Nerve*. 1983;(October):574–80.
 28. Almeida CF, Fernandes SA, Ribeiro Junior AF, Keith Okamoto O, Vainzof M. Muscle satellite cells: Exploring the basic biology to rule them. *Stem Cells Int*. 2016;2016.
 29. Scharner J, Zammit PS. The muscle satellite cell at 50: The formative years. *Skelet Muscle*. 2011;1(1):28. Available from: <http://www.skeletalmusclejournal.com/content/1/1/28>
 30. Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*. 2000;102(6):777–86.

31. Biressi S, Molinaro M, Cossu G. Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development. *Dev Biol.* 2007;308(2):281–93.
32. Mukund K, Subramaniam S. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2020;12(1):1–46.
33. Halevy O, Novitsch BG, Spicer DB, Skapek SX, Hannon GJ, Beach D, et al. Correlation of Terminal Cell Cycle Arrest of Skeletal Muscle with Induction of p21 by MyoD. *Science (80-)*. 1995;267(5200):1018–21.
34. Zanou N, Gailly P. Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: Interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(21):4117–30.
35. Morgan J, Partridge T. Skeletal muscle in health and disease. *DMM Dis Model Mech.* 2020;13(2).
36. Schmidt M, Schüler SC, Hüttner SS, von Eyss B, von Maltzahn J. Adult stem cells at work: regenerating skeletal muscle. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(13):2559–70. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03093-6>
37. Endo T. Molecular mechanisms of skeletal muscle development, regeneration, and osteogenic conversion. *Bone.* 2015;80:2–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2015.02.028>
38. Brack AS, Conboy IM, Conboy MJ, Shen J, Rando TA. A Temporal Switch from Notch to Wnt Signaling in Muscle Stem Cells Is Necessary for Normal Adult Myogenesis. *Cell Stem Cell.* 2008;2(1):50–9.
39. Rudolf A, Schirwis E, Giordani L, Parisi A, Lepper C, Taketo MM, et al. β -Catenin Activation in Muscle Progenitor Cells Regulates Tissue Repair. *Cell Rep.* 2016;15(6):1277–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.022>
40. Girardi F, Le Grand F. Wnt Signaling in Skeletal Muscle Development and Regeneration [Internet]. Vol. 153, Progress in Molecular Biology and Translational Science. Elsevier Inc.; 2018. 157–179 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.11.026>
41. McFarlane C, Hui GZ, Amanda WZW, Lau HY, Lokireddy S, Xiaojia G, et al. Human myostatin negatively regulates human myoblast growth and differentiation. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2011;301(1).

42. Armand AS, Laziz I, Chanoine C. FGF6 in myogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1763:773–8.
43. Kendall RT, Feghali-Bostwick CA. Fibroblasts in fibrosis: Novel roles and mediators. *Front Pharmacol*. 2014;5:1–13.
44. Shi X, Garry DJ. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev*. 2006;20(13):1692–708.
45. Mourkioti F, Rosenthal N. IGF-1, inflammation and stem cells: Interactions during muscle regeneration. *Trends Immunol*. 2005;26(10):535–42.
46. Klingberg F, Hinz B, White ES. The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *J Pathol*. 2013;229(2):298–309.
47. Vannella KM, Wynn TA. Mechanisms of Organ Injury and Repair by Macrophages. *Annu Rev Physiol*. 2017;79(1):593–617.
48. Baghdadi MB, Tajbakhsh S. Regulation and phylogeny of skeletal muscle regeneration. *Dev Biol*. 2018;433(2):200–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.07.026>
49. Arsic N, Zacchigna S, Zentilin L, Ramirez-Correa G, Pattarini L, Salvi A, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates skeletal muscle regeneration in Vivo. *Mol Ther*. 2004;10(5):844–54.
50. Frey SP, Jansen H, Raschke MJ, Meffert RH, Ochman S. VEGF improves skeletal muscle regeneration after acute trauma and reconstruction of the limb in a rabbit model. *Clin Orthop Relat Res*. 2012;470(12):3607–14.
51. Liu J, Saul D, Böker KO, Ernst J, Lehman W, Schilling AF. Current Methods for Skeletal Muscle Tissue Repair and Regeneration. *Biomed Res Int*. 2018;11.
52. Mcdonald CM. Clinical approach to the diagnostic evaluation of hereditary and acquired neuromuscular diseases. *NIH public access*. 2011;23(1):1–7.
53. Demir YP. Neuromuscular Diseases and Rehabilitation. *Neurol Phys Ther*. 2017;
54. Dowling JJ, Gonorasky HD, Cohn RD, Campbell C. Treating pediatric neuromuscular disorders: The future is now. 2018;804–41.
55. Castiglioni C, Jofré J, Suárez B. Enfermedades neuromusculares. Epidemiología y políticas de salud en Chile. *Rev Médica Clínica Las Condes*. 2018;29(6):594–8.

56. Lilleker JB, Keh YS, Roncaroli F, Sharma R, Roberts M. Metabolic myopathies: A practical approach. *Pract Neurol*. 2018;18(1):14–26.
57. Koo P, Sethi JM. Metabolic Myopathies and the Respiratory System. *Clin Chest Med*. 2018;39(2):401–10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2018.02.001>
58. Toscano A, Barca E, Musumeci O. Update on diagnostics of metabolic myopathies. *Curr Opin Neurol*. 2017;30(5):553–62.
59. Klopstock T, Dimauro S. Metabolic Myopathies. *Neurol Disord Course Treat Second Ed*. 2003;1385–405.
60. Roy AJ, Van den Bergh P, Van Damme P, Doggen K, Van Casteren V. Early stages of building a rare disease registry, methods and 2010 data from the Belgian Neuromuscular Disease Registry (BNMDR). *Acta Neurol Belg*. 2015;115(2):97–104. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13760-014-0320-0>
61. Barba-Romero MA, Barrot E, Bautista-Lorite J, Gutiérrez-Rivas E, Illa I, Jiménez LM, et al. Guía clínica de la enfermedad de pompe de inicio tardío. *Rev Neurol*. 2012;54(8):497–507. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84861306041&partnerID=MN8TOARS>
62. van der Ploeg AT, Reuser AJ. Pompe's disease. *Lancet*. 2008;372:1342–53. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61555-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61555-X)
63. Kishnani PS, Steiner RD, Bali D, Berger K, Byrne BJ, Case L, et al. Pompe disease diagnosis and management guideline. *Genet Med*. 2006;8(5):267–88.
64. Lim JA, Li L, Raben N. Pompe disease: From pathophysiology to therapy and back again. *Front Aging Neurosci*. 2014;6:1–14.
65. Al Jasmi F, Al Jumah M, Alqarni F, Al-Sanna'a N, Al-Sharif F, Bohlega S, et al. Diagnosis and treatment of late-onset Pompe disease in the Middle East and North Africa region: Consensus recommendations from an expert group. *BMC Neurol*. 2015;15(1):1–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12883-015-0412-3>
66. Raben N, Plotz P, Byrne B. Acid alpha-Glucosidase Deficiency (Glycogenosis Type II, Pompe Disease). *Curr Mol Med*. 2005;2(2):145–66.
67. Müller-Felber W, Horvath R, Gempel K, Podskarbi T, Shin Y, Pongratz D, et al. Late onset Pompe disease: Clinical and neurophysiological spectrum of 38 patients including long-

- term follow-up in 18 patients. *Neuromuscul Disord.* 2007;17(9–10):698–706.
- 68.** Bodamer OA, Ronald Scott C, Giugliani R. Newborn screening for pompe disease. *Pediatrics.* 2017;140(July).
- 69.** Chiang SC, Hwu WL, Lee NC, Hsu LW, Chien YH. Algorithm for Pompe disease newborn screening: Results from the Taiwan screening program. *Mol Genet Metab.* 2012;106(3):281–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.04.013>
- 70.** Mechtler TP, Stary S, Metz TF, De Jesús VR, Greber-Platzer S, Pollak A, et al. Neonatal screening for lysosomal storage disorders: Feasibility and incidence from a nationwide study in Austria. *Lancet.* 2012;379(9813):335–41. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61266-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61266-X)
- 71.** Wittmann J, Karg E, Turi S, Legnini E, Wittmann G, Giese A-K, et al. Newborn Screening for Lysosomal Storage Disorders in Hungary. *JIMD Rep.* 2011;1(January):73–8.
- 72.** Kohler L, Puertollano R, Raben N. Pompe Disease: From Basic Science to Therapy. *Neurotherapeutics.* 2018;15(4):928–42.
- 73.** Thurberg BL, Maloney CL, Vaccaro C, Afonso K, Tsai ACH, Bossen EH, et al. Characterization of pre- and post-treatment pathology after enzyme replacement therapy for Pompe disease. *Lab Invest.* 2006;86(12):1208–20.
- 74.** Lim J-A, Meena NK, Raben N. Pros and cons of different ways to address dysfunctional autophagy in Pompe disease. *Ann Transl Med.* 2019;7(13):279–279.
- 75.** Korovila I, Hugo M, Castro JP, Weber D, Höhn A, Grune T, et al. Proteostasis, oxidative stress and aging. *Redox Biol.* 2017;13(July):550–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2017.07.008>
- 76.** Onorati A V., Dyczynski M, Ojha R, Amaravadi RK. Targeting autophagy in cancer. *Cancer.* 2018;124(16):3307–18.
- 77.** Palhegyi AM, Seranova E, Dimova S, Hoque S, Sarkar S. Biomedical Implications of Autophagy in Macromolecule Storage Disorders. *Front Cell Dev Biol.* 2019;7(September):1–17.
- 78.** Li F, Guo H, Yang Y, Feng M, Liu B, Ren X, et al. Autophagy modulation in bladder cancer development and treatment (Review). *Oncol Rep.* 2019;42(5):1647–55.
- 79.** Farah BL, Yen PM, Koeberl DD. Links between autophagy and disorders of glycogen

- metabolism – Perspectives on pathogenesis and possible treatments. *Mol Genet Metab.* 2020;129(1):3–12. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2019.11.005>
80. Lim JA, Li L, Kakhlon O, Myerowitz R, Raben N. Defects in calcium homeostasis and mitochondria can be reversed in Pompe disease. *Autophagy.* 2015;11(2):385–402.
 81. Dombi E, Mortiboys H, Poulton J. Modulating Mitophagy in Mitochondrial Disease. *Curr Med Chem.* 2017;25(40):5597–612.
 82. Palikaras K, Lionaki E, Tavernarakis N. Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology. *Nat Cell Biol.* 2018;20(9):1013–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41556-018-0176-2>
 83. Hesselink RP, Wagenmakers AJM, Drost MR, Van Der Vusse GJ. Lysosomal dysfunction in muscle with special reference to glycogen storage disease type II. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2003;1637(2):164–70.
 84. Pompe J. Over idiopathische hypertrophie van het hart. *Ned Tijdschr Geneeskd.* 1932;76:304–11.
 85. Kishnani PS, Hwu WL, Mandel H, Nicolino M, Yong F, Corzo D. A retrospective, multinational, multicenter study on the natural history of infantile-onset Pompe disease. *J Pediatr.* 2006;148(5).
 86. Hers HG. alpha-Glucosidase deficiency in generalized glycogenstorage disease (Pompe's disease). *Biochem J.* 1963;86(1959):11–6.
 87. Toscano A, Rodolico C, Musumeci O. Multisystem late onset Pompe disease (LOPD): an update on clinical aspects. *Ann Transl Med.* 2019;7(13):284–284.
 88. Echaniz-Laguna A, Carlier RY, Laloui K, Carlier P, Salort-Campana E, Pouget J, et al. Should patients with asymptomatic pompe disease be treated? A nationwide study in France. *Muscle and Nerve.* 2015;51(6):884–9.
 89. Martiniuk F, Bodkin M, Tzall S, Hirschhorn R. Isolation and Partial Characterization of the Structural Gene for Human Acid Alpha Glucosidase. *DNA Cell Biol.* 1991;10(4):283–92.
 90. Hermans MMP, Van Leenen D, Kroos MA, Beesley CE, Van Der Ploeg AT, Sakuraba H, et al. Twenty-Two Novel Mutations in the Lysosomal α -Glucosidase Gene (GAA) Underscore the Genotype-Phenotype Correlation in Glycogen Storage Disease Type II. *Hum Mutat.* 2004;23(1):47–56.

91. Toscano A, Montagnese F, Musumeci O. Early is better? A new algorithm for early diagnosis in Late Onset Pompe Disease (LOPD). *Acta Myol.* 2013;32:78–81.
92. Figueroa-Bonaparte S, Llauger J, Segovia S, Belmonte I, Pedrosa I, Montiel E, et al. Quantitative muscle MRI to follow up late onset Pompe patients: A prospective study. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–11.
93. Nuñez-Peralta C, Alonso-Pérez J, Llauger J, Segovia S, Montesinos P, Belmonte I, et al. Follow-up of late-onset Pompe disease patients with muscle magnetic resonance imaging reveals increase in fat replacement in skeletal muscles. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2020;
94. Figueroa-Bonaparte S, Segovia S, Llauger J, Belmonte I, Pedrosa I, Alejaldre A, et al. Muscle MRI findings in childhood/adult onset pompe disease correlate with muscle function. *PLoS One.* 2016;11(10):1–19.
95. Musumeci O, Toscano A. Diagnostic tools in late onset Pompe disease (LOPD). *Ann Transl Med.* 2019;7(13):286–286.
96. Chamoles NA, Niizawa G, Blanco M, Gaggioli D, Casentini C. Glycogen storage disease type II: Enzymatic screening in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta.* 2004;347(1–2):97–102.
97. Bay LB, Denzler I, Durand C, Eiroa H, Frabasil J, Fainboim A, et al. Enfermedad de Pompe infantil: Diagnóstico y tratamiento. *Arch Argent Pediatr.* 2019;117(4):271–8.
98. Bobillo Lobato J, Durán Parejo P, Tejero Díez P, Jiménez Jiménez LM. Glucosa tetrasacárido como biomarcador diagnóstico de la enfermedad de Pompe: Estudio en 35 pacientes. *Med Clin (Barc).* 2013;141(3):106–10.
99. Kishnani PS, Corzo D, Nicolino M, Byrne B, Mandel H, Hwu WL, et al. Recombinant human acid α -glucosidase: Major clinical benefits in infantile-onset Pompe disease. *Neurology.* 2007;68(2):99–109.
100. Ghosh P, Dahms NM, Kornfeld S. Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(March):202–12.
101. Parini R, De Lorenzo P, Dardis A, Burlina A, Cassio A, Cavarzere P, et al. Long term clinical history of an Italian cohort of infantile onset Pompe disease treated with enzyme replacement therapy. *Orphanet J Rare Dis.* 2018;13(1):1–12.

102. Harlaar L, Hogrel JY, Perniconi B, Kruijshaar ME, Rizopoulos D, Taouagh N, et al. Large variation in effects during 10 years of enzyme therapy in adults with Pompe disease. *Neurology*. 2019;93(19):e1756–67.
103. Kuperus E, Kruijshaar ME, Wens SCA, De Vries JM, Favejee MM, Van Der Meijden JC, et al. Long-term benefit of enzyme replacement therapy in Pompe disease: A 5-year prospective study. *Neurology*. 2017;89(23):2365–73.
104. Fernández-Simón E, Carrasco-Rozas A, Gallardo E, González-Quereda L, Alonso-Pérez J, Belmonte I, et al. Study of the effect of anti-rhGAA antibodies at low and intermediate titers in late onset Pompe patients treated with ERT. *Mol Genet Metab*. 2019;128(1–2):129–36. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2019.07.013>
105. Groeneveld GJ, Ph D, Herson S, Kishnani PS, Laforet P, Lake SL, et al. A Randomized Study of Alglucosidase Alfa in Late-Onset Pompe's Disease. 2010;
106. Ravaglia S, Pichiecchio A, Ponzio M, Danesino C, Garaghani KS, Poloni GU, et al. Changes in skeletal muscle qualities during enzyme replacement therapy in late-onset type II glycogenosis: Temporal and spatial pattern of mass vs. strength response. *J Inherit Metab Dis*. 2010;33(6):737–45.
107. Schoser B, Stewart A, Kanters S, Hamed A, Jansen J, Chan K, et al. Survival and long-term outcomes in late-onset Pompe disease following alglucosidase alfa treatment: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol*. 2017;264(4):621–30.
108. Pena LDM, Barohn RJ, Byrne BJ, Desnuelle C, Goker-Alpan O, Ladha S, et al. Safety, tolerability, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and exploratory efficacy of the novel enzyme replacement therapy avalglucosidase alfa (neoGAA) in treatment-naïve and alglucosidase alfa-treated patients with late-onset Pompe disease: A phase 1, o. *Neuromuscul Disord*. 2019;29(3):167–86. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2018.12.004>
109. Díaz-Manera J, Kishnani PS, Kushlaf H, Ladha S, Mozaffar T, Straub V, et al. Safety and efficacy of avalglucosidase alfa versus alglucosidase alfa in patients with late-onset Pompe disease (COMET): a phase 3, randomised, multicentre trial. *Lancet Neurol*. 2021;20(12):1012–26.
110. Xu S, Lun Y, Frascella M, Garcia A, Soska R, Nair A, et al. Improved efficacy of a next-generation ERT in murine Pompe disease. *JCI insight*. 2019;4(5):1–20.

111. Schoser B, Roberts M, Byrne BJ, Sitaraman S, Jiang H, Laforêt P, et al. Safety and efficacy of cipaglucosidase alfa plus miglustat versus alglucosidase alfa plus placebo in late-onset Pompe disease (PROPEL): an international, randomised, double-blind, parallel-group, phase 3 trial. *Lancet Neurol.* 2021;20(12):1027–37.
112. Corti M, Liberati C, Smith BK, Lawson LA, Tuna IS, Conlon TJ, et al. Safety of Intradiaphragmatic Delivery of Adeno-Associated Virus-Mediated Alpha-Glucosidase (rAAV1-CMV-hGAA) Gene Therapy in Children Affected by Pompe Disease. *Hum Gene Ther Clin Dev.* 2017;28(4):208–18.
113. Falk DJ, Soustek MS, Todd AG, Mah CS, Cloutier DA, Kelley JS, et al. Comparative impact of AAV and enzyme replacement therapy on respiratory and cardiac function in adult Pompe mice. *Mol Ther - Methods Clin Dev.* 2015;2(June 2014):15007.
114. McCall AL, Stankov SG, Cowen G, Cloutier D, Zhang Z, Yang L, et al. Reduction of Autophagic Accumulation in Pompe Disease Mouse Model Following Gene Therapy. *Curr Gene Ther.* 2019;19(3):197–207.
115. Bobillo Lobato J, Jiménez Hidalgo M, Jiménez Jiménez L. Biomarkers in Lysosomal Storage Diseases. *Diseases.* 2016;4(4):40.
116. Aronson JK, Ferner RE. Biomarkers - a general review. *Curr Protoc Pharmacol.* 2017;2017(March).
117. FitzGerald GA. Measure for Measure: Biomarker standards and transparency. *Sci Transl Med.* 2016;8(343):8–10.
118. Güller I, Russell AP. MicroRNAs in skeletal muscle: their role and regulation in development, disease and function. *J Physiol.* 2010;588(21):4075–87. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.2010.194175>
119. Chen J-F, Callis TE, Wang D-Z. microRNAs and muscle disorders. *J Cell Sci.* 2009;122:13–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19092056> http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19092056?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum
120. Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 2009;19(1):92–105.

121. Chang T-C, Mendell JT. microRNAs in Vertebrate Physiology and Human Disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2007;8(1):215–39.
122. Horak M, Novak J, Bienertova-Vasku J. Muscle-specific microRNAs in skeletal muscle development. *Dev Biol.* 2016;410(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.12.013>
123. Diniz GP, Wang DZ. Regulation of Skeletal muscle by micro RNAs. *Compr Physiol.* 2016;6(July):1279–94.
124. Seo MS, Scarr E, Lai CY, Dean B. Potential molecular and cellular mechanism of psychotropic drugs. *Clin Psychopharmacol Neurosci.* 2014;12(2):94–110.
125. De Guire V, Robitaille R, Tétreault N, Guérin R, Ménard C, Bambace N, et al. Circulating miRNAs as sensitive and specific biomarkers for the diagnosis and monitoring of human diseases: Promises and challenges. *Clin Biochem.* 2013;46(10–11):846–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.03.015>
126. Chakraborty C, Das S. Profiling cell-free and circulating miRNA: a clinical diagnostic tool for different cancers. *Tumor Biol.* 2016;37(5):5705–14.
127. Matsuzaka Y, Kishi S, Aoki Y, Komaki H, Oya Y, Takeda S, et al. Three novel serum biomarkers, miR-1, miR-133a, and miR-206 for Limb-girdle muscular dystrophy, Facioscapulohumeral muscular dystrophy, and Becker muscular dystrophy. *Environ Health Prev Med.* 2014;19:452–8.
128. Israeli D, Poupiot J, Amor F, Charton K, Lostal W, Jeanson-Leh L, et al. Circulating miRNAs are generic and versatile therapeutic monitoring biomarkers in muscular dystrophies. *Sci Rep.* 2016;6(May):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep28097>
129. Siracusa J, Koulmann N, Banzet S. Circulating myomiRs: a new class of biomarkers to monitor skeletal muscle in physiology and medicine. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2018;9(1):20–7.
130. Li N, Zhou H, Tang Q. miR-133: A suppressor of cardiac remodeling? *Front Pharmacol.* 2018;9(AUG).
131. Nohata N, Hanazawa T, Enokida H, Seki N. MicroRNA-1/133a and microRNA-206/133b clusters: Dysregulation and functional roles in human cancers. *Oncotarget.* 2012;3(1):9–21.

132. Coletti D, Daou N, Hassani M, Li Z, Parlakian A. Serum Response Factor in muscle tissues: from development to ageing. *Eur J Transl Myol.* 2016;26(2):87–92.
133. Rosenberg MI, Georges SA, Asawachaicharn A, Analau E, Tapscott SJ. MyoD inhibits Fstl1 and Utrn expression by inducing transcription of miR-206. *J Cell Biol.* 2006;175(1):77–85.
134. Mitchelson KR, Qin W-Y. Roles of the canonical myomiRs miR-1, -133 and -206 in cell development and disease. *World J Biol Chem.* 2015;6(3):162.
135. Sun Y, Ge Y, Drnevich J, Zhao Y, Band M, Chen J. Mammalian target of rapamycin regulates miRNA-1 and follistatin in skeletal myogenesis. *J Cell Biol.* 2010;189(7):1157–69.
136. van der Ploeg AT, Kruijshaar ME, Toscano A, Laforêt P, Angelini C, Lachmann RH, et al. European consensus for starting and stopping enzyme replacement therapy in adult patients with Pompe disease: a 10-year experience. *Eur J Neurol.* 2017;24(6):768-e31.
137. Marabita F, De Candia P, Torri A, Tegnér J, Abrignani S, Rossi RL. Normalization of circulating microRNA expression data obtained by quantitative real-time RT-PCR. *Brief Bioinform.* 2016;17(2):204–12.
138. Perkins JR, Dawes JM, McMahan SB, Lh Bennett D, Orengo C, Kohl M. ReadqPCR and NormqPCR: R packages for the reading, quality checking and normalisation of RT-qPCR quantification cycle (Cq) data. *BMC Genomics.* 2012;13:296. Available from: <http://www.biomedcentral.com/http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/ReadqPCR.html> and <http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/NormqPCR.html>
139. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;3(7):2747–59. Available from: <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
140. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 2001;25(4):402–8.
141. Sauer E, Babion I, Madea B, Courts C. An evidence based strategy for normalization of quantitative PCR data from miRNA expression analysis in forensic organ tissue identification. *Forensic Sci Int Genet.* 2014;13:217–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.08.005>

142. Askanas V, Engel WK. A new program for investigating adult human skeletal muscle grown aneurally in tissue culture. *Neurology*. 1975;25(1):58–67.
143. Mamchaoui K, Trollet C, Bigot A, Negroni E, Chaouch S, Wolff A, et al. Immortalized pathological human myoblasts: Towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders. *Skelet Muscle*. 2011;1(1):34. Available from: <http://www.skeletalmusclejournal.com/content/1/1/34>
144. De Luna N, Suárez-Calvet X, Lleixà C, Diaz-Manera J, Olivé M, Illa I, et al. Hypoxia triggers IFN- γ production in muscle: Implications in dermatomyositis. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–9.
145. Suárez-Calvet X, Gallardo E, Pinal-Fernandez I, De Luna N, Lleixà C, Díaz-Manera J, et al. RIG-I expression in perifascicular myofibers is a reliable biomarker of dermatomyositis. *Arthritis Res Ther*. 2017;19(1):1–7.
146. Peng H, Long F, Ding C. Feature selection based on mutual information: Criteria of Max-Dependency, Max-Relevance, and Min-Redundancy. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell*. 2005;27(8):1226–38.
147. Kira K, Rendell LA. The feature selection problem: traditional methods and a new algorithm. *AAAI*. 1992;122–6.
148. Guyon I, Weston J, Barnhill S. Gene Selection for Cancer Classification using Support Vector Machines. *Mach Learn*. 2002;46:389–422.
149. Ververidis D, Kotropoulos C. Fast and accurate sequential floating forward feature selection with the Bayes classifier applied to speech emotion recognition. *Signal Processing*. 2008;88(12):2956–70.
150. Christin C, Hoefsloot HCJ, Smilde AK, Hoekman B, Suits F, Bischoff R, et al. A critical assessment of feature selection methods for biomarker discovery in clinical proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2013;12(1):263–76.
151. Russell S, Norvig P. Artificial intelligence: a modern approach. Pearson Education; 2003.
152. Sharma M, Juvvuna PK, Kukreti H, Mcfarlane C. Mega roles of microRNAs in regulation of skeletal muscle health and disease. *Front Physiol*. 2014;5:239.
153. Gao A, Jiang J, Xie F, Chen L. Bnip3 in mitophagy: Novel insights and potential therapeutic target for diseases of secondary mitochondrial dysfunction. *Clin Chim Acta*. 2020;506:72–83. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.02.024>

154. Lim J, Li L, Shirihaï OS, Trudeau KM, Puertollano R, Raben N. Modulation of mTOR signaling as a strategy for the treatment of Pompe disease. *EMBO Mol Med.* 2017;9(3):353–70.
155. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* 2011;13(2):132–41.
156. Egan DF, Kim J, Shaw RJ, Guan K-L. The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. Vol. 7, *Autophagy*. Taylor and Francis Inc.; 2011. p. 643–4.
157. Quinsay MN, Lee Y, Rikka S, Sayen MR, Molkenin JD, Gottlieb RA, et al. Bnip3 mediates permeabilization of mitochondria and release of cytochrome c via a novel mechanism. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48(6):1146–56.
158. Ow YLP, Green DR, Hao Z, Mak TW. Cytochrome c: Functions beyond respiration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(7):532–42.
159. Schaaf GJ, van Gestel TJM, In 't Groen SLM, de Jong B, Boomaars B, Tarallo A, et al. Satellite cells maintain regenerative capacity but fail to repair disease-associated muscle damage in mice with Pompe disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2018;6(1):119.
160. Nascimbeni AC, Fanin M, Masiero E, Angelini C, Sandri M. The role of autophagy in the pathogenesis of glycogen storage disease type II (GSDII). *Cell Death Differ.* 2012;19(10):1698–708.
161. Raben N, Takikita S, Pittis MG, Bembi B, Marie SKN, Roberts A, et al. Deconstructing pompe disease by analyzing single muscle fibers: "To see a world in a grain of sand..." *Autophagy.* 2007;3(6):546–52.
162. Raben N, Schreiner C, Baum R, Takikita S, Xu S, Xie T, et al. Suppression of autophagy permits successful enzyme replacement therapy in a lysosomal storage disorder - Murine Pompe disease. *Autophagy.* 2010;6(8):1078–89.
163. Romero-Cordoba SL, Salido-Guadarrama I, Rodriguez-Dorantes M, Hidalgo-Miranda A. miRNA biogenesis: biological impact in the development of cancer. *Cancer Biol Ther.* 2014;15(11):1444–55.
164. Mcdaniel K, Herrera L, Zhou T, Francis H, Han Y, Levine P, et al. The functional role of microRNAs in alcoholic liver injury. *J Cell Mol Med.* 2014;18(2):197–207.

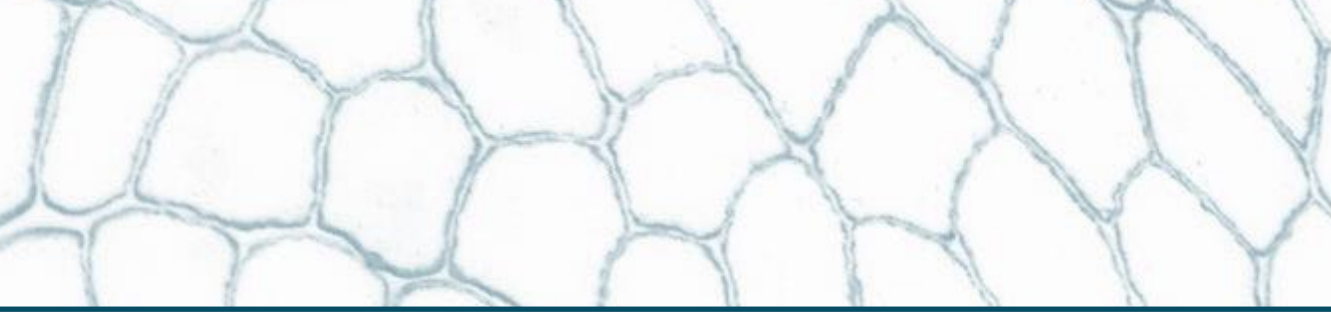
165. Katz MG, Fargnoli AS, Williams RD, Kendle AP, Steuerwald NM, Bridges CR. MiRNAs as potential molecular targets in heart failure. *Future Cardiol.* 2014;10(6):789–800.
166. Zaharieva IT, Calissano M, Scoto M, Preston M, Cirak S, Feng L, et al. Dystromirs as serum biomarkers for monitoring the disease severity in Duchenne Muscular Dystrophy. *PLoS One.* 2013;8(11).
167. Perfetti A, Greco S, Bugiardini E, Cardani R, Gaia P, Gaetano C, et al. Plasma microRNAs as biomarkers for myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul Disord.* 2018;24(6):509–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2014.02.005>
168. Koutsoulidou A, Kyriakides TC, Papadimas GK, Christou Y. Elevated muscle-specific miRNAs in serum of Myotonic Dystrophy patients relate to muscle disease progress. 2015;10(4):e0125341. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0125341>
169. Perfetti A, Greco S, Cardani R, Fossati B, Cuomo G, Valaperta R, et al. Validation of plasma microRNAs as biomarkers for myotonic dystrophy type 1. *Sci Rep.* 2016;6:38174. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep38174>
170. Hak KK, Yong SL, Sivaprasad U, Malhotra A, Dutta A. Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. *J Cell Biol.* 2006;174(5):677–87.
171. Tarallo A, Carissimo A, Gatto F, Nusco E, Toscano A, Musumeci O, et al. microRNAs as biomarkers in Pompe disease. *Genet Med.* 2018;0(0):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41436-018-0103-8>
172. Carrasco-Rozas A, Fernández-Simón E, Lleixà MC, Belmonte I, Pedrosa-Hernandez I, Montiel-Morillo E, et al. Identification of serum microRNAs as potential biomarkers in Pompe disease. *Ann Clin Transl Neurol.* 2019;6(7):1214–24.
173. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Clarke BA, Poueymirou WT, et al. Identification of Ubiquitin Ligases Required for Skeletal Muscle Atrophy. *Am Assoc Adv Sci.* 2001;294(5547):1704–8.
174. Nascimbeni AC, Fanin M, Masiero E, Angelini C, Sandri M. Impaired autophagy contributes to muscle atrophy in glycogen storage disease type II patients. *Autophagy.* 2012;8(11):1697–700.
175. Lecker SH, Goldberg AL, Mitch WE. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(7):1807–19.

176. Wollersheim T, Woehlecke J, Krebs M, Hamati J, Lodka D, Luther-Schroeder A, et al. Dynamics of myosin degradation in intensive care unit-acquired weakness during severe critical illness. *Intensive Care Med.* 2014;40(4):528–39.
177. Mair D, Biskup S, Kress W, Abicht A, Brück W, Zechel S, et al. Differential diagnosis of vacuolar myopathies in the NGS era. *Brain Pathol.* 2020;30(5):877–96.
178. Malicdan MC V., Nishino I. Autophagy in lysosomal myopathies. *Brain Pathol.* 2012;22(1):82–8.
179. Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, et al. FoxO3 Controls Autophagy in Skeletal Muscle In Vivo. *Cell Metab.* 2007;6(6):458–71.
180. Fordjour PA, Wang L, Gao H, Li L, Wang Y, Nyagblordzro M, et al. Targeting BNIP3 in inflammation-mediated heart failure: a novel concept in heart failure therapy. *Heart Fail Rev.* 2016;21(5):489–97.
181. Tarallo A, Damiano C, Strollo S, Minopoli N, Indrieri A, Polishchuk E, et al. Correction of oxidative stress enhances enzyme replacement therapy in Pompe disease. *EMBO Mol Med.* 2021;13(11):1–21.
182. Alderton JM, Steinhardt RA. How calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *Trends Cardiovasc Med.* 2000;10(6):268–72.
183. Ishigaki K, Mitsuhashi S, Kuwatsuru R, Murakami T, Shishikura K, Suzuki H, et al. High-density areas on muscle CT in childhood-onset Pompe disease are caused by excess calcium accumulation. *Acta Neuropathol.* 2010;120(4):537–43.
184. Zhang J, Ney PA. Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. *Cell Death Differ.* 2009;16(7):939–46.
185. Kubasiak LA, Hernandez OM, Bishopric NH, Webster KA. Hypoxia and acidosis activate cardiac myocyte death through the Bcl-2 family protein BNIP3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(20):12825–30.
186. Ney PA. Mitochondrial autophagy: Origins, significance, and role of BNIP3 and NIX. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2015;1853(10):2775–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.02.022>
187. O’neill KL, Huang K, Zhang J, Chen Y, Luo X. Inactivation of prosurvival Bcl-2 proteins

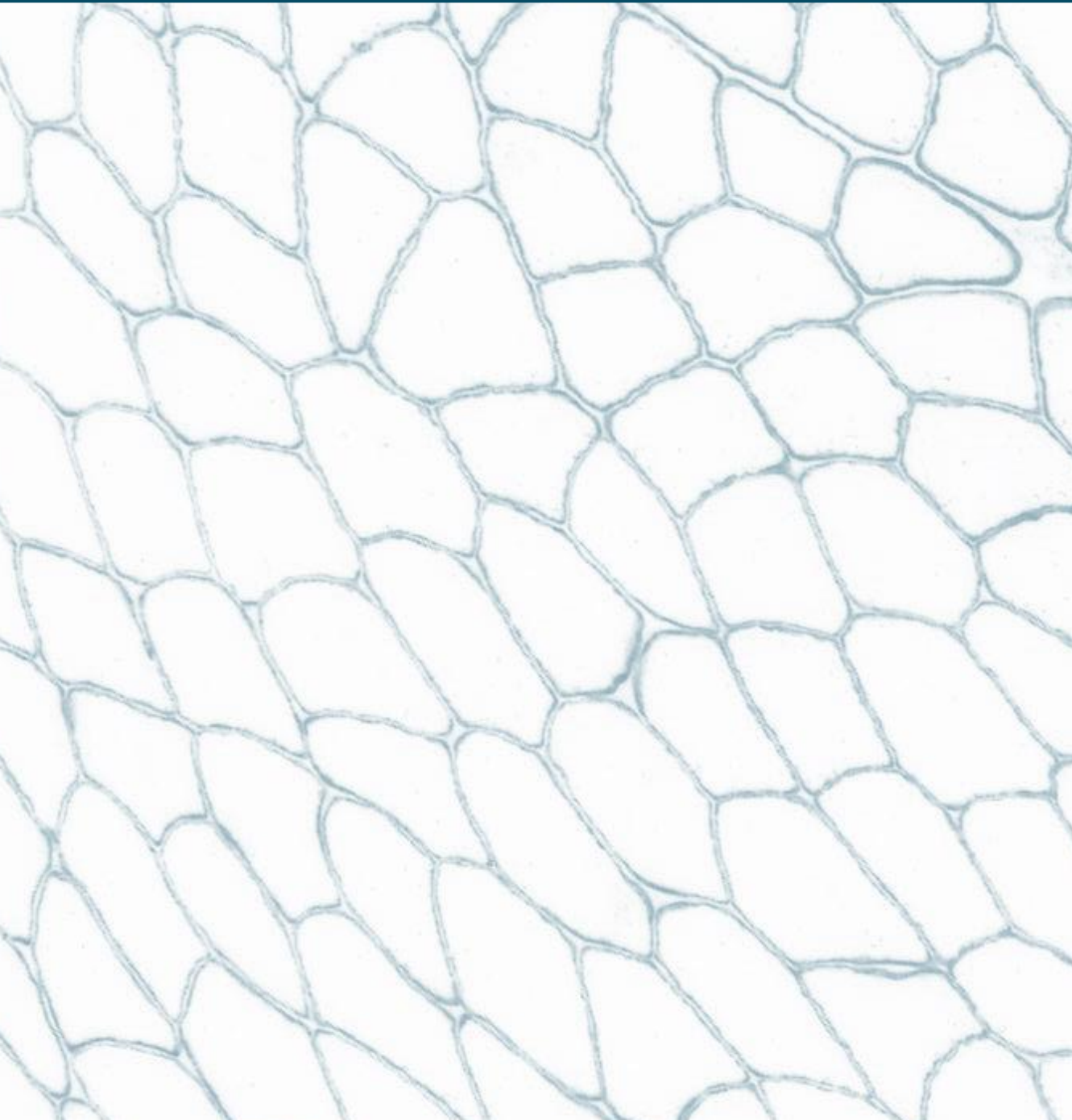
- activates Bax/Bak through the outer mitochondrial membrane. *Genes Dev.* 2016;30(8):973–88.
- 188.** Ray R, Chen G, Velde C Vande, Cizeau J, Park JH, Reed JC, et al. BNIP3 heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-X(L) and induces cell death independent of a Bcl-2 homology 3 (BH3) domain at both mitochondrial and nonmitochondrial sites. *J Biol Chem.* 2000;275(2):1439–48.
- 189.** Dorstyn L, Akey CW, Kumar S. New insights into apoptosome structure and function. *Cell Death Differ.* 2018;25(7):1194–208. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41418-017-0025-z>
- 190.** Shakeri R, Kheirollahi A, Davoodi J. Apaf-1: Regulation and function in cell death. *Biochimie.* 2017;135:111–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2017.02.001>
- 191.** Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Yee ST, Jin HB, Wesley JB, et al. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem.* 2008;283(16):10892–903.
- 192.** Elmore SP, Qian T, Grissom SF, Lemasters JJ. The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes. *FASEB J.* 2001;15(12):2286–7.
- 193.** Liu L, Feng D, Chen G, Chen M, Zheng Q, Song P, et al. Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nat Cell Biol.* 2012;14(2):177–85.
- 194.** Moriggi M, Capitanio D, Torretta E, Barbacini P, Bragato C, Sartori P, et al. Muscle proteomic profile before and after enzyme replacement therapy in late-onset pompe disease. *Int J Mol Sci.* 2021;22(6):1–20.
- 195.** Fanin M, Nascimbeni AC, Angelini C. Muscle atrophy, ubiquitin-proteasome, and autophagic pathways in dysferlinopathy. *Muscle and Nerve.* 2014;50(3):340–7.
- 196.** Fanin M, Nascimbeni AC, Angelini C. Muscle atrophy in Limb Girdle Muscular Dystrophy 2A: A morphometric and molecular study. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2013;39(7):762–71.
- 197.** De Palma C, Morisi F, Cheli S, Pambianco S, Cappello V, Vezzoli M, et al. Autophagy as a new therapeutic target in Duchenne muscular dystrophy. *Cell Death Dis.*

2012;3(11):e418-10.

- 198.** Franekova V, Storjord HI, Leivseth G, Nilssen Ø. Protein homeostasis in LGMDR9 (LGMD2I) – The role of ubiquitin–proteasome and autophagy–lysosomal system. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2021;47(4):519–31.
- 199.** Field JT, Martens MD, Mughal W, Hai Y, Chapman D, Hatch GM, et al. Misoprostol regulates Bnip3 repression and alternative splicing to control cellular calcium homeostasis during hypoxic stress. *Cell Death Discov.* 2018;4(1):98. Available from: doi.org/10.1038/s41420-018-0104-z
- 200.** Carrasco-Rozas A, Fernández-Simón E, Suárez-Calvet X, Piñol-Jurado P, Alonso-Pérez J, de Luna N, et al. BNIP3 Is Involved in Muscle Fiber Atrophy in Late-Onset Pompe Disease Patients. *Am J Pathol.* 2022;(May). Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2022.05.003>



10. ANEXO



10.1. Anexo 1

Carrasco-Rozas A, Fernández-Simón E, Lleixà MC, Belmonte I, Pedrosa-Hernandez I, Montiel-Morillo E, et al. Identification of serum microRNAs as potential biomarkers in Pompe disease. *Ann Clin Transl Neurol.* 2019;6(7):1214–24.



RESEARCH ARTICLE

Identification of serum microRNAs as potential biomarkers in Pompe disease

Ana Carrasco-Rozas¹, Esther Fernández-Simón¹, María Cinta Lleixà¹, Izaskun Belmonte², Irene Pedrosa-Hernandez², Elena Montiel-Morillo², Claudia Nuñez-Peralta³, Jaume Llauger Rossello³, Sonia Segovia^{1,4}, Noemí De Luna^{1,4}, Xavier Suarez-Calvet^{1,4}, Isabel Illa^{1,4}, Pompe Spanish Study group, Jordi Diaz-Manera^{1,4*} & Eduard Gallardo^{1,4*}

¹Neuromuscular Disorders Unit, Neurology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

²Rehabilitation and Physiotherapy Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

³Radiology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

⁴Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras, Valencia, Spain

Correspondence

Jordi Diaz-Manera and Eduard Gallardo, Neuromuscular disorders Unit, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, C/ Sant Antoni M^o Claret 167, Barcelona 08025, Spain. Tel: +34-935565986; Fax: +34-935565602; E-mails: jdiazm@santpau.cat; egallardo@santpau.cat

Funding information

This study was supported by a grant from Sanofi-Genzyme (GZ-2015-11342) to Dr. Gallardo and has been registered in Clinicaltrials.gov (identifier NCT03045042).

Coinvestigators – The Spanish Pompe Study Group: Miguel Angel Barba-Romero (Hospital General de Albacete, Albacete, Spain), Joseba Barcena (Hospital Universitario Cruces, Baracaldo, Spain), María Rosario Carzoria (Hospital Puerta de Hierro, Majadahonda, Spain), Carlota Creus (Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain), Jaume Coll-Cantí (Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain), Noemí de Luna (Neuromuscular Disorders Unit, Neurology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain), Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER), Manuel Diaz (Hospital de Cabueñes, Gijón, Spain), Cristina Domínguez (Hospital 12 de Octubre, Madrid & Instituto de Investigación i+12, Madrid, Spain), Roberto Fernández-Torrón (Hospital Universitario Donostia, Spain), María José García Antelo (Hospital Universitario A Coruña, A Coruña, Spain), Josep María Grau (Hospital Clinic, Barcelona, Spain), María Teresa Gómez Caravaca (Hospital de Córdoba, Spain), Juan

Abstract

Objective: To analyze the microRNA profile in serum of patients with Adult Onset Pompe disease (AOPD). **Methods:** We analyzed the expression of 185 microRNAs in serum of 15 AOPD patients and five controls using microRNA PCR Panels. The expression levels of microRNAs that were deregulated were further studied in 35 AOPD patients and 10 controls using Real-Time PCR. Additionally, the skeletal muscle expression of microRNAs which showed significant increase levels in serum samples was also studied. Correlations between microRNA serum levels and muscle function test, spirometry, and quantitative muscle MRI were performed (these data correspond to the study NCT01914536 at ClinicalTrials.gov). **Results:** We identified 14 microRNAs that showed different expression levels in serum samples of AOPD patients compared to controls. We validated these results in a larger cohort of patients and we found increased levels of three microRNAs, the so called dystromirs: miR-1-3p, miR-133a-3p, and miR-206. These microRNAs are involved in muscle regeneration and the expression of these was increased in patients' muscle biopsies. Significant correlations between microRNA levels and muscle function test were found. **Interpretation:** Serum expression levels of dystromirs may represent additional biomarkers for the follow-up of AOPD patients.

Carlos León Hernández (Hospital Universitario Nuestra Señora de la Candelaria, Tenerife, Spain), Adolfo López de Munáin (Hospital Universitario Donostia, Spain), Francisco Antonio Martínez-García (Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain), Yolanda Morgado (Hospital Universitario Virgen de Valme, Sevilla, Spain), Antonio Moreno (Hospital Universitario Morales Meseguer, Murcia, Spain), Germán Morís (Hospital Universitario de Asturias, Oviedo, Spain), Miguel Angel Muñoz-Blanco (Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain), Andres Nascimento (Hospital Virgen del Rocío, Sevilla, Spain), Carmen Paradas (Hospital Virgen del Rocío, Sevilla, Spain), José Luis Parajúa Pozo (Hospital de Can Mises, Ibiza, Spain), Luis Querol (Neuromuscular Disorders Unit, Neurology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER), Spain), Arturo Robledo-Strauss (Hospital Juan Ramón Jiménez, Huelva, Spain), Ricard Rojas García (Neuromuscular Disorders Unit, Neurology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER), Íñigo Rojas-Marcos (Hospital Virgen de Macarena, Sevilla, Spain), Jose Antonio Salazar (Hospital Regional Universitario de Málaga, Spain), Mercedes Usón (Hospital de Son Llàtzer, Palma de Mallorca, Spain).

Received: 14 March 2019; Revised: 3 May 2019; Accepted: 4 May 2019

Annals of Clinical and Translational Neurology 2019; 6(7): 1214–1224

doi: 10.1002/acn3.50800

*These authors equally contributed to this work.

Introduction

Pompe disease is an autosomal recessive disorder produced by mutations in the *GAA* gene that encodes for the lysosomal enzyme acid alpha-glucosidase.¹ This enzyme is essential for the degradation of glycogen to glucose in lysosomes.² Mutations in the *GAA* gene cause absence or deficiency of the enzyme leading to an accumulation of glycogen in the lysosomes of several tissues particularly cardiac, skeletal, and smooth muscle.³

Patients are classified as infantile (IOPD) or adult onset Pompe disease (AOPD) depending on the age at onset of symptoms.³ Classic IOPD patients have a rapidly progressive disorder characterized by hypotonia, muscle weakness, respiratory insufficiency, and hypertrophic cardiomyopathy that lead patients to death before the first year of life if untreated.⁴ AOPD patients have a more heterogeneous clinical picture ranging from asymptomatic HyperCKemia to weakness involving limb, axial, and respiratory muscles.⁵ Natural history studies have shown that

AOPD is a slowly progressive disorder in which most of the patients will present moderate to severe motor disability developing respiratory insufficiency and needing noninvasive ventilation.⁶

Enzyme replacement therapy (ERT) with recombinant alpha-glucosidase has changed natural history of the disease. In infantile patients, the treatment reduces the risk of death improving cardiomyopathy and respiratory function.^{7,8} In AOPD patients, ERT improves and stabilizes muscle function for a period of 2–3 years and afterwards motor function slowly deteriorates.⁹ There is an active discussion in the scientific community to know which tests are most sensitive to identify changes in muscle performance in AOPD patients after shorter periods of time^{10,11}. ERT is not approved for asymptomatic AOPD patients, therefore these patients are being followed up using motor function tests to identify changes in motor performance that can support starting ERT. However it is possible that irreversible muscle degeneration has already started without influencing motor function. The identification of new tools to follow-up progression of patients is one of the hottest topics in the neuromuscular disorders field. In this sense, quantitative muscle MRI (qMRI) has revealed to be useful in several muscle disorders including Pompe disease.^{10,12} However, qMRI is not available in all centers and, experience is needed to analyze it properly. Therefore, other potential biomarkers are needed and serum molecules such as microRNAs (miRNAs) could be useful.

A good biomarker should be detected in a sample that can be obtained by minimally invasive procedures for the patient. In this sense, serum or plasma is the best candidates.¹³ miRNAs are small noncoding RNAs that exert their effect on gene expression at the posttranscriptional level. They have a length of approximately 22 nucleotides and, in general, they inhibit protein synthesis or favor mRNA degradation by binding to the UTR 3' regions of those mRNAs.¹⁴ Each miRNA regulates several target genes and a given gene can be regulated by multiple miRNAs.¹⁵ miRNAs regulate several processes in skeletal muscle such as muscle growth, atrophy, or regeneration. A specific group of miRNAs, known as dystromirs are distinctly expressed in serum of patients with muscle dystrophies. They have been studied in Duchenne muscle dystrophy (DMD), Becker muscle dystrophy of facio-scapulo-humeral muscle dystrophy (FSHD), but they have not been analyzed in serum samples of patients with AOPD.¹⁶

In this project, we studied the serum expression of 190 miRNAs, including the so called dystromirs, in a group of 35 AOPD patients and 10 controls with the following aims: (1) identify miRNAs that were up- or downregulated in AOPD patients; (2) investigate if they could be used as biomarkers of progression of the disease and; (3) understand the pathophysiology of muscle degeneration in Pompe disease.

Material and Methods

Patient and study design

This study is part of an ongoing prospective open-label study in which we are following up a group of symptomatic and nonsymptomatic AOPD patients using muscle function tests, muscle MRI, and blood analysis. This study has been registered in Clinicaltrials.gov (identifier NCT01914536). The study was approved by The Ethics Committee of Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP) in Barcelona. All participants signed an appropriate informed consent form. All patients included fulfilled the diagnostic criteria of Pompe disease established by the European Pompe Consortium.¹⁷

We defined a patient as symptomatic when we identified muscle weakness in clinical examination using the Medical Research Council score (MRC) or when Forced Vital Capacity (FVC) seated was lower than 85%. We included in this study a total of 35 patients: 21 symptomatic patients treated with ERT, nine symptomatic patients nontreated with ERT and five asymptomatic patients. Clinical and genetic data of this Pompe cohort have been previously published.¹⁰ Nontreated symptomatic patients were visited before starting ERT. We also studied 10 age and sex-matched healthy controls.

miRNA isolation in serum sample

Serum miRNAs were isolated from serum with DANA-GENE microRNA and Cell free RNA Kit (DANAGEN, Badalona, Spain) using MS2 RNA (Roche, Basel, Switzerland) as a carrier to improve the RNA isolation and exogenous controls (Unisp2,4 and 5). miRNAs were retrotranscribed into a cDNA with the miRCURY LNATM Universal RT microRNA PCR (EXIQON).

Analysis of miRNA expression in serum

miRNA expression studies consisted two different phases: discovery and validation. For the discovery phase, we selected five serum samples from four different groups: controls, asymptomatic AOPD, symptomatic nontreated AOPD and symptomatic AOPD-treated patients. For the validation phase, we used samples from 10 healthy control and 35 Pompe patients.

Discovery phase

miRNAs were measured by qPCR using Serum/Plasma Focus microRNA PCR 384 wells Panels, (V4.M) (EXIQON). Results were analyzed with software available online by Applied Biosystems (SDS 2.4). Mean and SD

were calculated and a statistical analysis of the raw data was performed by ANAXOMICS, a consulting company expert in the analysis of miRNA data. The relative levels of selected serum miRNAs were normalized by using cel-miR-39-3p and Unisp6 as spike-in¹⁸ and the miRNAs has-miR-126-3p, has-miR-151a-3p, and has-miR-21-5p were identified by applying the geNorm algorithm¹⁹, a pair-wise stability-based method previously described.²⁰

Validation phase

The miRNAs identified in the discovery phase were subsequently studied in the validation phase. Although miR-206 was not included in the panels used for the discovery phase but was also included in this phase because it is one of the already described dystromirs, together with miR-1-3p and miR-133a-3p.²¹ miR-126-3p was used as an endogenous normalizer. ExiLENT SYBR Green master mix (QIAGEN, Venlo, Netherlands) and miRCURY LNA miRNA PCR Assays (QIAGEN) to study each miRNAs. We studied 21 miRNA: 14 problem miRNAs, one normalizer, two hemolysis controls and four exogenous controls. Relative miRNA expression was analyzed using comparative Ct method with the SDS 2.4 software.²²

Analysis of miRNA expression in muscle

We analyzed the expression levels of miRNAs in muscles obtained from AOPD patients ($n = 4$) and healthy controls ($n = 5$). Muscle miRNAs were isolated using DANAGENE microRNA Kit (DANAGEN). For this technique, we also used MS2 (MS2 RNA, Roche) and exogenous controls for the RNA isolation. For miRNA expression analysis, ExiLENT SYBR Green master mix (QIAGEN) and different miRCURY LNA miRNA PCR Assays (QIAGEN) were used for each of the miRNAs. We used U6 snRNA (RNU6-2) as an endogenous control to normalize the data.²³

Muscle function tests

The following muscle function tests were performed: 6 min walking test (6MWT), time to walk 10 meters, timed up-and-go test, time to climb up and down four steps, and motor function measure-20 items scale (MFM-20). Muscle strength was studied using both MRC and hand-held myometry. ACTIVLIM, INQoL, and SF-36 were used as patient reported outcome measures. Forced vital capacity seated and in lying position was obtained with a spirometer Carefusion Microlab ML 3500 MK8 (Carefusion, Yorba Linda, CA, USA).

Muscle imaging

All patients were examined in a Philips Achieva XR 1.5 Teslas located at HSCSP. Three-dimensional 3-point Dixon images were acquired and ROIs were manually drawn in the areas of interest as previously described¹⁰. Mean thighs fat fraction was calculated from the data acquired and used for the statistical analysis.

Data analysis

Discovery phase

ANOVA tests were performed to identify differences in miRNA expression levels between cohorts. *P*-values were adjusted for multiple testing using Tukey-Kramer correction. Dataset with all the variables from the individual patients was analyzed using a data science strategy based on data mining approach, in which, the following methods were used: as feature selection and extraction algorithms CHOW-LIU, MRMR, RELIEFF, RFE-SVM, SFFS, and Wilcoxon with correlation and as the base classifier GLM_Binomial and Naive Bayes.^{24–29} In order to prioritize the generalization capability of the conclusion, a K-fold validation analysis was performed, yielding cross-validated quality measures (such as accuracy) for each biomarker. The study was carried out with and without imputed missing values. The imputation method applied used the k-nearest neighbor averaging, using Euclidean metric in the space of each miRNA by cohort to impute the missing values elements.¹⁸

Validation phase

We used nonparametric tests for the statistical analysis of the variables. We used the Mann-Whitney U test to investigate whether there were significant differences in the variables between groups (asymptomatic vs symptomatic/controls vs Pompe).

Clinical correlation

We used Spearman's rank correlation (coefficient reported as) to investigate whether there was a correlation between serum miRNA expression and the clinical results. As we run multiple correlations, a Bonferroni test was performed to avoid type 1 error. The results of all statistical studies were considered significant if *P* was lower than 0.05. Statistical studies were performed using IBM SPSS® Statistics software version 21.

Results

Description of the cohort

We included in the study 35 AOPD patients. Thirty patients were symptomatic and five were asymptomatic. Twenty-one out of the 30 symptomatic patients were already receiving ERT when the first sample was obtained. In the remaining nine symptomatic patients, blood samples were obtained before ERT was started. Demographic and clinical data of the patients are described in Table 1. We also included samples from 10 age and sex-matched controls.

miRNA expression in the discovery phase

We observed different expression levels between the groups of study in nine of the 185 miRNAs included in the discovery assay (ANOVA, $P < 0.05$). Expression levels of these nine miRNAs were further analyzed in the validation phase. These miRNAs included: miR-106b-5p, miR-199a-5p, miR-652-3p, miR-423-5p, miR-1-3p, miR-133a-3p, miR-186-5p, miR-338-3p, and miR-23a-3p. We also included in the validation phase a group of miRNAs that have been involved in the muscle degeneration process: miR-206, miR-145-5p, miR-181-5p, miR-486 and miR-29a-3p.²¹

miRNA expression in the validation phase

We observed a statistically significant increase in the concentration of miR-1-3p and miR-206 between AOPD patients and controls (Mann–Whitney U test, $P < 0.05$) (Fig. 1A and C). We also analyzed if there were differences between the different subgroups of study: asymptomatic AOPD, symptomatic nontreated AOPD, symptomatic-treated AOPD and controls. We observed significant differences between symptomatic-treated AOPD patients and controls in the expression of miR-1-3p, miR-133a-3p and miR-206 (Mann–Whitney U test, $P < 0.05$), (Fig. 1). In miR-206, we also observed

significant differences between asymptomatic and symptomatic-treated AOPD patients (Mann–Whitney U test, $P < 0.05$) (Fig. 1C). Although we identified other potential miRNAs in the discovery phase none of them showed significant differences in the validation phase (Fig. 2). Normalized relative expression levels of serum miRNAs in Pompe patients. Data are presented as mean \pm SD. Mann–Whitney U test.

Expression of dystromirs in the progression of the disease

We decided to study if starting ERT treatment modified serum levels of dystromirs (miR-1-3p, miR-133a-3p and miR-206). We studied samples for three patients that were obtained before and 6 months to 1 year after starting ERT treatment. Dystromirs serum levels increased in two patients while they decreased in one of the patients (Fig. 3). However, we did not apply any statistical study due to the small size of our cohort.

miRNA expression in muscle

We observed a statistically significant increase in the concentration of miR-206 in muscle biopsies from AOPD patients taken before the treatment was started ($n = 4$) compared to controls ($n = 5$) (Fig. 4C). Although the differences observed in miR-1-3p and miR-133a-3p muscle expression were not statistically significant, there was a trend to be increased in patients compared to controls (Fig. 4A and B).

Correlations between clinical features and miRNAs serum levels

We identified a statistically significant correlation between serum levels of miR-1-3p, miR-133a-3p, and miR-206a in AOPD patients (Spearman test, $P < 0.05$ (Table 2). We also investigated if there were correlations between serum levels dystromirs and clinical features of the patients. We did not identify any correlation between age at study, age

Table 1. Clinical characteristics of the control group and the Pompe patients included in the study. Mean and standard deviation are provided for the quantitative variables.

Clinical characteristics	Control $n = 10$	Asymptomatic $n = 5$	Nontreated $n = 9$	Treated $n = 21$
Age	41.2 \pm 16.4	24 \pm 8.2	50.6 \pm 11.4	50.81 \pm 8.6
Sex (male/female)	6/4	2/3	6/3	7/15
Time from onset of symptoms	–	–	9.4 \pm 6.6	15 \pm 9.1
Time on ERT	–	–	–	5.1 \pm 2.5
Aids for walking	–	–	0	10
Ventilation	–	–	2	9

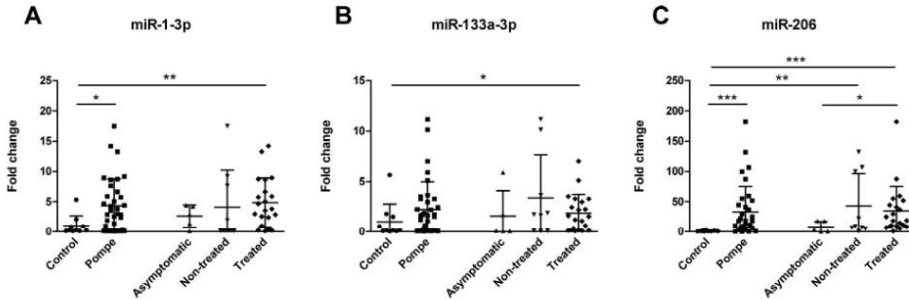


Figure 1. Normalized relative expression levels of validated serum miRNAs in Pompe patients. Data are presented as mean \pm SD. Mann-Whitney U test * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

at start of ERT, time on ERT or delay in the start of ERT, and serum levels of miRNAs. In contrast, we identified significant correlations (Spearman test, $P < 0.05$) between dystromirs' serum levels and some of the muscle function tests (Table 2). However, the correlation coefficients were lower than 0.6. There was a correlation between mean thighs fat fraction analyzed using quantitative muscle MRI and miR-206 serum levels, although as it happened with muscle function tests, the correlation coefficient was lower than 0.

Discussion

The aim of this work was to study miRNA profiles in Pompe disease patients and evaluate their role as potential biomarkers. We studied the expression of 190 miRNAs in AOPD patients and controls and we found increased expression levels in AOPD patients in three miRNAs: miR-1-3p, miR-133a-3p, and miR-206. These differences were more robust when we compared serum levels of symptomatic patients with controls. Moreover, serum levels of miR-206 were higher in symptomatic than presymptomatic patients, suggesting that it could be a valid biomarker of disease progression. Despite this finding, we identified weak correlations between muscle function tests and serum levels of miRNAs.

Several reports have demonstrated that miRNAs are potential biomarkers of different diseases, such as cancer, liver injury, or heart failure.^{30–32} The expression profile of miRNAs has also been studied in different muscle diseases such as DMD, myotonic dystrophy, and FSHD.^{16,33–36} In these studies, several miRNAs have a different pattern of expression when compared to controls. Three of them, the miR-1-3p, miR-133a-3p and miR-206, are persistently increased in muscular dystrophies and for this reason are

known as dystromirs. Dystromirs are only expressed by heart and skeletal muscle and, therefore, they can potentially be a valuable tool to follow muscle pathology in patients with muscle disorders. The function of dystromirs in the process of muscle degeneration and regeneration has been investigated. While miR-133 enhances proliferation of myoblasts, miR-1 and miR-206 promote differentiation from myoblasts to myotubes. Dystromirs expression is regulated by MyoD, Myf5, MEF2, SRF, and other transcription factors involved in muscle development.^{37,38} The process of muscle degeneration in Pompe disease is not completely understood. Reduced expression of alpha-glucosidase leads to a progressive accumulation of glycogen inside the lysosomes of muscle fibers disrupting the physiologic process of autophagy. As a result, glycogen charged lysosomes and autophagic vesicles are found in the sarcoplasm, disrupting the contractile properties of skeletal muscle fibers. Eventually, the muscle fiber dies and is replaced by fat and fibrous tissue resembling what happens in muscle dystrophies. In view of this fact, it is reasonable to find increased serum levels of dystromirs in AOPD patients, as happens in other muscle dystrophies, reinforcing the idea that Pompe disease and muscle dystrophies may share a pathologic process of muscle degeneration.

As dystromirs are related with the muscle regeneration process, it is not surprising that they are increased in muscle disorders, especially in those patients in whom the process of muscle degeneration is active. We observed that dystromirs were more expressed in symptomatic than asymptomatic AOPD patients. Specifically, the expression of miR-206 was significantly higher in serum samples of symptomatic compared to asymptomatic AOPD patients. Therefore, miR-206 serum levels may have a role as a potential biomarker to follow-up presymptomatic patients

microRNAs in Pompe Disease

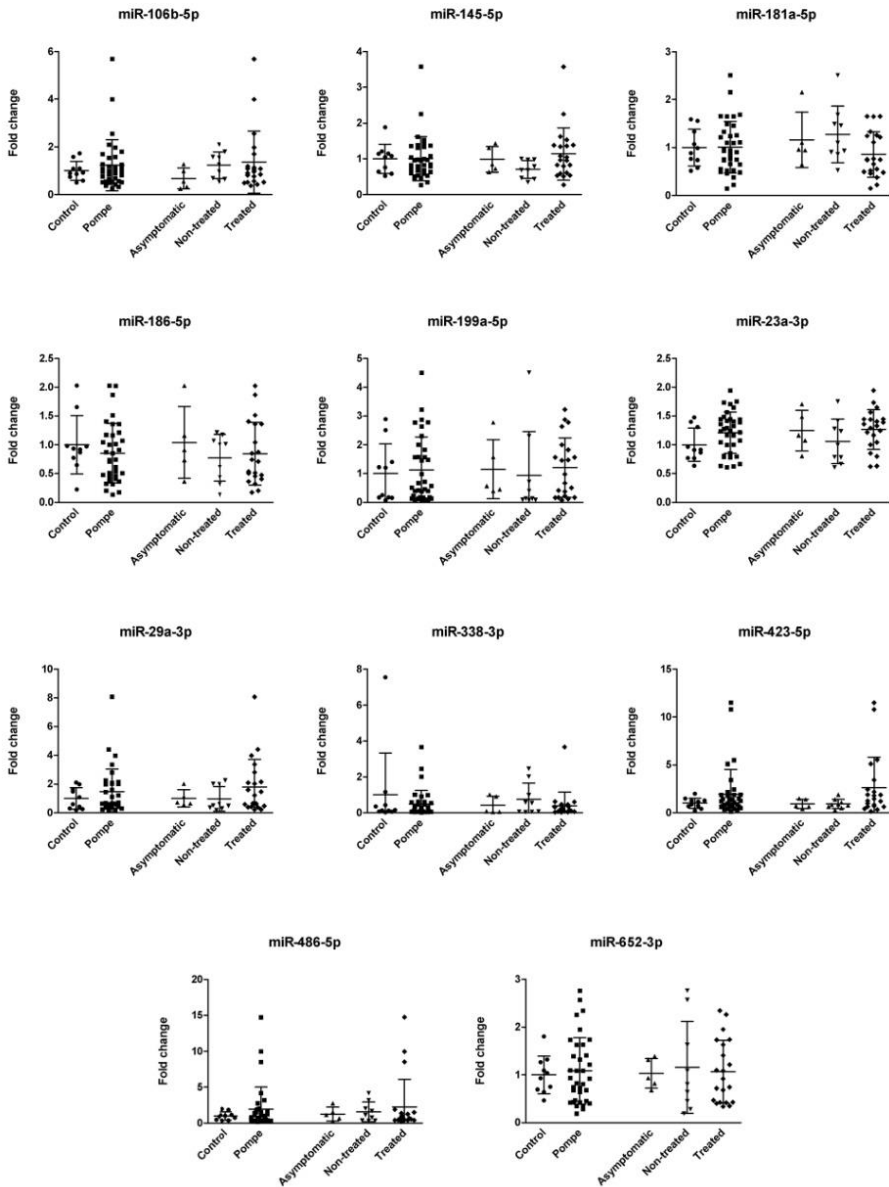
A. Carrasco-Rozas *et al.*

Figure 2. Normalized relative expression levels of serum miRNAs in Pompe patients. Data are presented as mean \pm SD. Mann–Whitney *U* test.

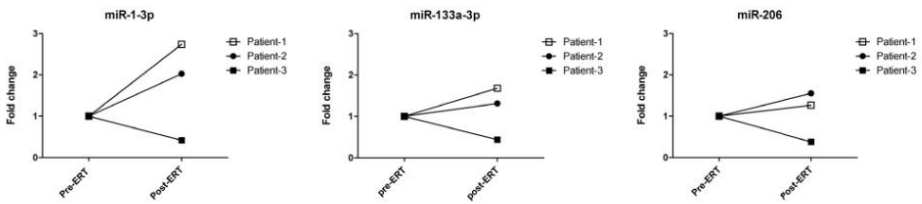


Figure 3. Dystromir expression changes in Pompe patients in response to the treatment. Data are presented as fold change values in post-ERT patients regarding their pre-ERT samples.

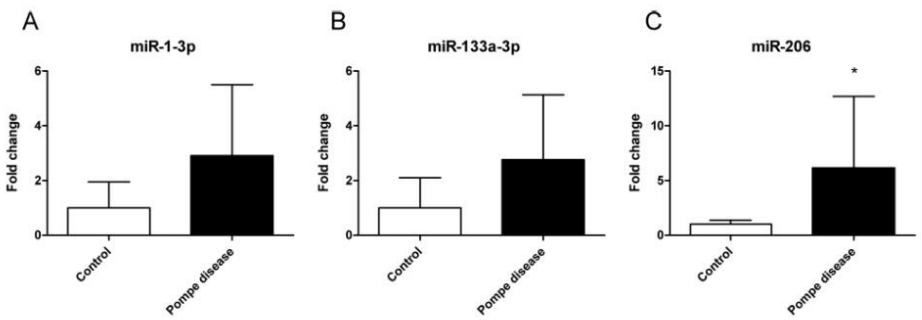


Figure 4. Normalized relative expression levels of muscle miRNAs in Pompe patients. Data are presented as mean \pm SD. Mann-Whitney *U* test **P* < 0.05.

Table 2. Correlation between microRNAs serum levels and clinical features.

	miR-1-3p		miR-133a-3p		miR-206	
	Sig	CC	Sig	CC	Sig	CC
miR-1-3p	–	–	0.007	0.457**	0	0.761**
miR-133a-3p	0.007	0.457**	–	–	0.003	0.493**
miR-206	0.000	0.761**	0.003	0.493**	–	–
MRC score	0.089	–	0.094	–	0.035	–0.385*
Myometry score	0.899	–	0.803	–	0.337	–
6MWT	0.803	–	0.073	–	0.584	–
Time to walk 10 m	0.514	–	0.043	0.378*	0.151	–
Timed up-and-go test	0.446	–	0.061	–	0.589	–
Time to climb up 4 steps	0.386	–	0.053	–	0.119	–
Time to climb down 4 steps	0.855	–	0.12	–	0.211	–
MFM-20	0.388	–	0.039	–0.373*	0.064	–
CVF seated	0.465	–	0.025	–0.416*	0.243	–
CVF lying	0.286	–	0.057	–	0.535	–
Activim	0.628	–	0.986	–	0.462	–
qMRI fat fraction	0.107	–	0.205	–	0.013	0.420*

Sig, bilateral significance; CC, correlation coefficient.

*Spearman Rho test *P* < 0.05.

**Spearman Rho test *P* < 0.01.

over the years in order to identify patients in whom the process of muscle degeneration has started and are at risk of developing symptoms of muscle weakness. We did not observe differences in the serum levels of dystromirs between treated and nontreated symptomatic patients. However, a higher number of patients should be analyzed to draw conclusions on the effect of ERT on the muscle regeneration process in symptomatic Pompe disease. ERT has been shown to decrease glycogen accumulation in muscle fibers of preclinical animal models of the disease and also in patients. However, recent studies demonstrate that muscle weakness of treated AOPD patient progresses despite the treatment and that muscle fatty replacement, which is related to muscle degeneration process, increases over the years.^{9,10} Our finding supports that the process of muscle degeneration remains active despite the starting of the treatment in Pompe patients. In accordance, we did not observe a significant reduction in miRNA expression levels in serum samples obtained before and after the treatment. Recently, Tarallo et al studied the profile of miRNAs in Pompe disease and observed high expression levels of miR-133a-3p both in IOPD and AOPD patients.³⁹ These results are in accordance with our investigations, and suggest that miRNAs could be potential biomarkers of Pompe disease.

Other miRNAs have a role in skeletal muscle homeostasis both in health and in disease-regulating myogenesis, muscle atrophy or structural and metabolic changes related to aging or exercise²¹. These miRNAs include miR-23a, miR-29, miR-146a, miR-486, and miR-181 among others. We have studied serum expression levels of these miRNAs, but we did not find significant differences between AOPD patients and controls. However, although our cohort included 35 patients, it is possible that higher number of samples are needed to identify subtle changes in miRNA expression in serum. In this sense, analysis of miRNA expression using skeletal muscle biopsies should show higher differences. Nevertheless, muscle biopsies of patients are not always available. We studied miRNA expression of muscle biopsies and we confirmed higher expression levels of miR-206 in AOPD patients than in controls. Although miR-1-3p and miR-133a-3p levels were increased in AOPD muscle biopsies, we did not find significant differences with controls, mainly due to a high variability of miRNA expression.

In conclusion, we have identified a group of miRNAs with increased levels of expression in blood samples of patients with Pompe disease. The role of these miRNAs in muscle regeneration has been previously reported and suggests that there is a common pathological pathway between Pompe disease and muscle dystrophies.

Acknowledgments

We thank the people of the Neuromuscular Disorders Unit for their comments and continuous support. This study was supported by a grant from Sanofi-Genzyme (GZ-2015-11342) to Gallardo and has been registered in Clinicaltrials.gov (identifier NCT03045042).

Author Contributions

ACR performed the experimental part, analyzed the results, performed the statistical analysis and prepared the figures, and wrote the paper. EFS and CL designed the protocol, analyzed the results, and reviewed the paper. IB, IP, and EM designed the protocol, visited the patients, and acquired motor function data. CNP and JL visited the patients and reviewed the paper. SS coordinated the study, visited the patients and reviewed the paper. ND and XSC designed the protocol and reviewed the paper. II designed and discussed the protocol. JDM designed the protocol, visited the patients, analyzed the images, performed the statistical analysis, and wrote the paper. EG designed the protocol, analyzed the results, wrote the paper, and obtained funding for the study.

Conflict of Interest

This study (GZ-2015-11342) has been performed with funding from SANOFI/Genzyme.

References

1. van der Ploeg AT, Reuser AJ. Pompe's disease. *Lancet* 2008;372:1342–1353.
2. Nascimbeni AC, Fanin M, Masiero E, et al. The role of autophagy in the pathogenesis of glycogen storage disease type II (GSDII). *Cell Death Differ* 2012;19:1698–1708.
3. Dasouki M, Jawdat O, Almadhoun O, et al. Pompe disease: literature review and case series. *Neurol Clin* 2014;32:751–776.
4. Manganeli F, Ruggiero L. Clinical features of Pompe disease. *Acta Myol* 2013;32:82–84.
5. Desnuelle C, Salviati L. Challenges in diagnosis and treatment of late-onset Pompe disease. *Curr Opin Neurol* 2011;24:443–448.
6. van der Beek NA, de Vries JM, Hagemans ML, et al. Clinical features and predictors for disease natural progression in adults with Pompe disease: a nationwide prospective observational study. *Orphanet J Rare Dis* 2012;7:88.
7. Nicolino M, Byrne B, Wraith JE, et al. Clinical outcomes after long-term treatment with alglucosidase alfa in infants

- and children with advanced Pompe disease. *Genet Med* 2009;11:210–219.
8. Katzin LW, Amato AA. Pompe disease: a review of the current diagnosis and treatment recommendations in the era of enzyme replacement therapy. *J Clin Neuromuscul Dis* 2008;9:421–431.
 9. Kuperus E, Kruijshaar ME, Wens SCA, *et al.* Long-term benefit of enzyme replacement therapy in Pompe disease: a 5-year prospective study. *Neurology* 2017;89:2365–2373.
 10. Figueroa-Bonaparte S, Segovia S, Llauger J, *et al.* Muscle MRI findings in childhood/adult onset Pompe disease correlate with muscle function. *PLoS ONE* 2016;11: e0163493.
 11. Schoser B, Laforet P, Kruijshaar ME, *et al.* 20th ENMC International Workshop: formation of a European Network to develop a European data sharing model and treatment guidelines for Pompe disease Naarden, The Netherlands, 26–28 September 2014. *Neuromuscul Disord* 2015;25:674–678.
 12. Figueroa-Bonaparte S, Llauger J, Segovia S, *et al.* Quantitative muscle MRI to follow up late onset Pompe patients: a prospective study. *Sci Rep* 2018;8:10898.
 13. Cox TM. Biomarkers in lysosomal storage diseases. 2006.
 14. Chen JF, Callis TE, Wang DZ. microRNAs and muscle disorders. *J Cell Sci* 2009;122(Pt 1):13–20.
 15. Guller I, Russell AP. MicroRNAs in skeletal muscle: their role and regulation in development, disease and function. *J Physiol* 2010;588(Pt 21):4075–87.
 16. Matsuzaka Y, Kishi S, Aoki Y, *et al.* Three novel serum biomarkers, miR-1, miR-133a, and miR-206 for Limb-girdle muscular dystrophy, Facioscapulohumeral muscular dystrophy, and Becker muscular dystrophy. *Environ Health Prev Med* 2014;19:452–458.
 17. van der Ploeg AT, Kruijshaar ME, Toscano A, *et al.* European consensus for starting and stopping enzyme replacement therapy in adult patients with Pompe disease: a 10-year experience. *Eur J Neurol* 2017;24:768–e31.
 18. Marabita F, de Candia P, Torri A, *et al.* Normalization of circulating microRNA expression data obtained by quantitative real-time RT-PCR. *Brief Bioinform* 2016;17:204–212.
 19. Perkins JR, Dawes JM, McMahon SB, *et al.* ReadqPCR and NormqPCR: R packages for the reading, quality checking and normalisation of RT-qPCR quantification cycle (Cq) data. *BMC Genom* 2012;13:296.
 20. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3:RESEARCH0034.
 21. Sharma M, Juvvuna PK, Kukreti H, McFarlane C. Mega roles of microRNAs in regulation of skeletal muscle health and disease. *Front Physiol* 2014;5:239.
 22. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 2001;25:402–408.
 23. Sauer E, Babion I, Madea B, Courts C. An evidence based strategy for normalization of quantitative PCR data from miRNA expression analysis in forensic organ tissue identification. *Forensic Sci Int Genet* 2014;13: 217–223.
 24. Peng H, Long F, Ding C. Feature selection based on mutual information: criteria of max-dependency, max-relevance, and min-redundancy. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell* 2005;27:1226–1238.
 25. Kira K, Rendell LA. The feature selection problem: traditional methods and a new algorithm. *Proc of AAAI-92* 1992:122–126.
 26. Guyon I, Weston J, Bamhill S, Vapnik V. Gene selection for cancer classification using support vector machines. *Machine Learn* 2002;46:389–422.
 27. Ververidis D, Kotropoulos C. Fast and accurate sequential floating forward feature selection with the Bayes classifier applied to speech emotion recognition. *Signal Process* 2008;88:2956–2970.
 28. Christin C, Hoefsloot HC, Smilde AK, *et al.* A critical assessment of feature selection methods for biomarker discovery in clinical proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2013;12:263–276.
 29. Russell SJ, Norvig P. Artificial intelligence: a modern approach. Pearson. Education 2003.
 30. Romero-Cordoba SL, Salido-Guadarrama I, Rodriguez-Dorantes M, Hidalgo-Miranda A. miRNA biogenesis: biological impact in the development of cancer. *Cancer Biol Ther* 2014;15:1444–1455.
 31. McDaniel K, Herrera L, Zhou T, *et al.* The functional role of microRNAs in alcoholic liver injury. *J Cell Mol Med* 2014;18:197–207.
 32. Katz MG, Fargnoli AS, Williams RD, *et al.* MiRNAs as potential molecular targets in heart failure. *Future Cardiol* 2014;10:789–800.
 33. Zaharieva IT, Calissano M, Scoto M, *et al.* Dystromirs as serum biomarkers for monitoring the disease severity in Duchenne muscular Dystrophy. *PLoS ONE* 2013;8: e80263.
 34. Perfetti A, Greco S, Cardani R, *et al.* Validation of plasma microRNAs as biomarkers for myotonic dystrophy type 1. *Sci Rep* 2016;6:38174.
 35. Koutsoulidou A, Kyriakides TC, Papadimas GK, *et al.* Elevated muscle-specific miRNAs in serum of myotonic dystrophy patients relate to muscle disease progress. *PLoS ONE* 2015;10:e0125341.
 36. Perfetti A, Greco S, Bugiardini E, *et al.* Plasma microRNAs as biomarkers for myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul Disord* 2014;24:509–515.
 37. Kim HK, Lee YS, Sivaprasad U, *et al.* Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. *J Cell Biol* 2006;174:677–687.

microRNAs in Pompe Disease

A. Carrasco-Rozas *et al.*


38. Rosenberg MI, Georges SA, Asawachaicharn A, et al. MyoD inhibits Fstl1 and Utrn expression by inducing transcription of miR-206. *J Cell Biol* 2006;175:77–85.
39. Tarallo A, Carissimo A, Gatto F, et al. microRNAs as biomarkers in Pompe disease. *Genet Med* 2019;21:591–600.

10.2. Anexo 2

Carrasco-Rozas A, Fernández-Simón E, Suárez-Calvet X, Piñol-Jurado P, Alonso-Pérez J, de Luna N, et al. BNIP3 Is Involved in Muscle Fiber Atrophy in Late-Onset Pompe Disease Patients. *Am J Pathol.* 2022;(May).

ARTICLE IN PRESS

The American Journal of Pathology, Vol. ■, No. ■, ■ 2022



The American Journal of
PATHOLOGY

ajp.amjpathol.org

63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124

BNIP3 Is Involved in Muscle Fiber Atrophy in Late-Onset Pompe Disease Patients

Q2 Q1 Ana Carrasco-Rozas,* Esther Fernández-Simón,*[†] Xavier Suárez-Calvet,*[†] Patricia Piñol-Jurado,*[†] Jorge Alonso-Pérez,*[‡] Noemí de Luna,*[†] Benedikt Schoser,[§] Peter Meinke,[§] Cristina Domínguez-González,*[¶] Aurelio Hernández-Laín,^{||} Carmen Paradas,*^{**††} Eloy Rivas,^{††} Isabel Illa,*[†] Montse Olivé,*[†] Eduard Gallardo,*[†] and Jordi Díaz-Manera*^{††}

Q3 Q4 Q5 Q6 From the Neuromuscular Disorders Unit,* Neurology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and Biomedical Research Institute Sant Pau, Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain; the John Walton Muscular Dystrophy Research Center,[†] Newcastle University Translational and Clinical Research Institute, Newcastle Upon Tyne, United Kingdom; the Centro de Investigaciones Biomédicas en Red en Enfermedades Raras (CIBERER),[‡] Madrid, Spain; the Friedrich-Baur-Institute,[§] Department of Neurology, LMU Klinikum, Munich, Germany; the Department of Neurology,[¶] Neuromuscular Unit, 12 de Octubre University Hospital, Madrid, Spain; Research Institute of Hospital 12 de Octubre (i+12), Spanish Network for Biomedical Research in Rare Diseases (CIBERER), Spain; the Department of Pathology (Neuropathology),^{||} 12 de Octubre University Hospital, Madrid, Spain; Research Institute of Hospital 12 de Octubre (i+12), Madrid, Spain; the Neuromuscular Disorders Unit,** Department of Neurology, and the Department of Pathology,^{††} Instituto de Biomedicina de Sevilla, Hospital U. Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain; and the Centro de Investigación Biomédica en Red Sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED),^{††} Madrid, Spain

Accepted for publication May 4, 2022.

Q9 Address correspondence to Jordi Díaz-Manera, John Walton Muscular Dystrophy Research Center, Newcastle University, Center for Life, Central Parkway, Newcastle upon Tyne NE1 3BZ, United Kingdom; or Eduard Gallardo, Neuromuscular Disorders Unit, Research Institute of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, C/Sant Quintí 77, 08041 Barcelona, Spain. E-mail: jordi.diaz-manera@newcastle.ac or egallardo@santpau.cat.

Late-onset Pompe disease (LOPD) is a rare genetic disorder produced by mutations in the GAA gene and is characterized by progressive muscle weakness. LOPD muscle biopsies show accumulation of glycogen along with the autophagic vacuoles associated with atrophic muscle fibers. The expression of molecules related to muscle fiber atrophy in muscle biopsies of LOPD patients was studied using immunofluorescence and real-time PCR. BNIP3, a well-known atrogen, was identified as a potential mediator of muscle fiber atrophy in LOPD muscle biopsies. We observed that vacuolated fibers in LOPD patient muscle biopsies were smaller than nonvacuolated fibers and expressed BNIP3. Our data suggested that BNIP3 expression is regulated by inhibition of the AKT—mammalian target of rapamycin pathway, leading to phosphorylation of ULK1 at Ser317 by AMP-activated protein kinase. We studied myoblasts and myotubes obtained from LOPD patients and age-matched controls to confirm these results using different molecular techniques. Myotubes derived from LOPD patients were likewise smaller and expressed BNIP3. Conclusively, transfection of BNIP3 into control myotubes leads to myotube atrophy. These findings suggest a cascade that starts with the inhibition of the AKT—mammalian target of rapamycin pathway and activation of BNIP3 expression, leading to progressive muscle fiber atrophy. Our results open the door to potential new treatments targeting BNIP3 to reduce its deleterious effects on muscle fiber atrophy in Pompe disease. (*Am J Pathol* 2022, ■: 1–16; <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2022.05.003>)

Q11 Pompe disease is produced by mutations in the GAA gene that encodes the enzyme α -glucosidase, which metabolizes the breakdown of glycogen into glucose in the lysosomes.¹ Absence or deficiency of the enzyme leads to accumulation of glycogen in numerous tissues, including cardiac and skeletal muscle, which leads to the main clinical symptoms.² Pompe disease has two different phenotypes. Classic infantile-onset Pompe disease (IOPD) is characterized by symptom onset soon after birth; the symptoms consist of generalized muscle weakness and hypertrophic

Supported by Fundación Isabel Gemio funding (J.D.M. and E.G.), the Spanish Ministry of Health, Fondo Europeo de Desarrollo Regional-FEDER, Instituto de Salud Carlos III (Spain) FIS (PI18/1525) (J.D.M. and X.S.C.), Instituto de Salud Carlos III (Sara Borrell fellowship, CD18/00195; X.S.C.), and cofunded by European Regional Development Fund/European Social Fund, "investing in your future" (X.S.C.). E.G. and J.D.-M. contributed equally to this work. Disclosures: A.C.-R., X.S.-C., J.A.-P., N.d.L., I.I., M.O., E.G., and J.D.-M. are members of the European Reference Network for Neuromuscular Disease and members of XUECs (Xarxes d'Unitats d'Expertesa Clínica en Malalties Minoritàries).

ARTICLE IN PRESS

Carrasco-Rozas et al

cardiomyopathy, leading to death in the first year of life if patients are not treated.³⁻⁵ Nonsense mutations are commonly found in the *GAA* gene of IOPD patients, leading to almost absent expression of α -glucosidase. Late-onset Pompe disease (LOPD) is characterized by the onset of symptoms at any point after 2 years of age, which consist of slowly progressive skeletal and respiratory muscle weakness, leading to a variable degree of disability without involvement of the heart.^{6,7} LOPD patients usually have one or two missense mutations in the *GAA* gene that lead to reduced but not absent expression of α -glucosidase. However, biallelic variants in *GAA* are necessary to develop LOPD. Enzyme replacement therapy (ERT) with recombinant α -glucosidase has changed the natural history of the disease. In IOPD patients, the treatment improves cardiomyopathy and respiratory function and reduces patient mortality, extending life expectancy beyond the first year of life.⁸ In LOPD patients, ERT produces an initial improvement of symptoms, followed by stabilization of the disease for a period of 2 to 3 years that could be continued by a progressive worsening of motor function in a subset of patients.^{9,10}

Muscle biopsies of IOPD and LOPD patients show distinctive morphologic traits.¹¹ IOPD muscles are characterized by massive accumulation of glycogen inside lysosomes that can also be found free in the sarcoplasm. Fibers are often enlarged and appear hypertrophic.¹² In contrast, LOPD muscle biopsies are characterized by the presence of lysosomes loaded with glycogen, free glycogen in the sarcoplasm, prominent autophagic vacuoles, and atrophic muscle fibers.^{13,14} These differences in muscle morphology probably lead to different treatment responses, as has been previously discussed in open-label studies using ERT.^{13,15} Defective α -glucosidase leads to the progressive accumulation of glycogen within the lysosomes that are progressively enlarged, breaking up at later stages and releasing its content into the sarcoplasm of the fibers. The impaired autophagic process leads to the accumulation of abundant autophagic vacuoles that can be eliminated when the autophagic flux is restored by ERT treatment.^{16,17} It has been suggested that autophagy contributes to muscle fiber atrophy through up-regulation of muscle RING-finger protein-1 (MuRF-1), although it is not clear yet whether other molecules also have a role in Pompe pathogenesis.¹⁸ Uncovering the molecules involved in the muscle degeneration process could contribute to the identification of new targets for therapy. In this study, we have identified the prominent role of BCL2 and adenovirus E1B 19-kDa interacting protein 3 (BNIP3) in the muscle atrophy process and studied the mechanism leading to, and the consequences of, its increased expression in LOPD muscle fibers.

Materials and Methods

Patients and Muscle Biopsy

Muscle and cell samples from LOPD patients were included in the study. Muscle, sex, age at biopsy, genetic features,

and percentage vacuolated fibers in the muscle biopsies of the patients are shown in Table 1. ^(T1)

Muscle biopsies were performed as part of the diagnostic process of patients who were seen in neuromuscular referral units in three different hospitals in Spain. To provide healthy controls, patients who were undergoing orthopedic surgery kindly donated muscle biopsy samples to our biobank. The samples were from muscles that were not directly affected by the orthopedic issue. All participants signed an informed consent form, and all the procedures were performed in accordance with the Declaration of Helsinki. For histopathologic studies, the muscle biopsies were frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane, and cryosections were prepared. For Western blot and gene expression analysis, the muscle biopsies were directly frozen in the -80°C freezer. Finally, for cell culture, the muscle biopsies were cleaned and minced in 1- to 2-mm pieces and then stored under liquid nitrogen until they were cultured.

The muscle samples and their availability for different techniques are detailed in Supplemental Table S1.

All the procedures in this study were approved by the Ethics Committee of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau in accordance with the Declaration of Helsinki. ⁽¹⁴⁾

Histology, Immunohistochemistry, and Immunofluorescence

Cryosections of 12 muscle biopsies from LOPD patients were stained with routine histochemical stains following standardized procedures and then analyzed.¹⁹ We evaluated the presence of vacuoles in >80 muscle fibers per biopsy and classified them with a score from 0 to 4, depending on the presence and type of vacuoles (Figure 1A). A score of 0 indicated no presence of vacuoles within the muscle fibers, scores 1 to 2 indicated presence of small vacuoles, and scores 3 to 4 indicated large vacuoles inside muscle fibers that fill the sarcoplasm. We measured the minimum Feret diameter of these fibers using ImageJ software bundled with 32-bit Java version 1.8.0_172 (NIH, Bethesda, MD; <http://image.nih.gov/ij>, last accessed March 30, 2022). Alizarin red staining was performed to visualize the calcium deposit in the muscle biopsy of LOPD patients and was performed following standard techniques. A muscle biopsy from a Duchenne muscular dystrophy (DMD) patient was used as a positive control for the latter technique.

For immunohistologic studies, tissue sections were fixed with cold acetone/ethanol (1:1), washed with Tris-buffered saline, and treated with 3% hydrogen peroxide. To permeabilize and block the tissue, sections were treated with Tris-buffered saline containing 1% bovine serum albumin and 2% Triton and incubated with UltraCruz Blocking Reagent (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX). Muscle sections were incubated with primary and secondary antibodies, as shown in Table 2. The reaction product was visualized using VECTACTAIN Elite ABC-HRP and ImmPACT DAB Substrate Kits (Vector Laboratories,

Table 1 Characteristics of LOPD Patients Included in the Study

Patient samples	Muscle	Sex	Age of onset of symptoms, years	Age at biopsy, years	Mutations	% Vacuolated fiber (score ≥2)
Muscles						
Pompe muscle 1	Biceps	M	62	63	GAA c.-32-13T>G; GAA c.1657C>T	<1
Pompe muscle 2	Deltoid	F	27	46	GAA c.-32-13T>G; GAA c.1532C>A	10.74
Pompe muscle 3	Biceps	M	35	41	GAA c.2173C>T; GAA c.2173C>T	9.24
Pompe muscle 4	Unknown	F	48	62	GAA c.-32-13T>G; GAA c.236_246delCCACACAGTGC	15.73
Pompe muscle 5	Quadriceps	F	49	56	GAA c.-32-13T>G; GAA c.2600_2604delITGCTinsA	<1
Pompe muscle 6	Quadriceps	F	27	31	GAA c.-32-13T>G; GAA c.1192dupC	4.19
Pompe muscle 7	Unknown	M	36	41	GAA c.-32-13T>G; GAA c.875A>G (p.Y292C)	<1
Pompe muscle 8	Quadriceps	F	5	37	GAA c.-32-13T>G; GAA: exon 20 deletion	38.75
Pompe muscle 9	Quadriceps	F	20	53	GAA c.-32-13T>G; GAA c.1933G>T (p.D645Y)	29.17
Pompe muscle 10	Quadriceps	F	48	59	GAA: c.-32-13 T>G; GAA c. 2237G>A (p.W746*)	12.58
Pompe muscle 11	Quadriceps	M	14	48	GAA: c.-32-13 T>G; GAA: c.1432G>A (p.G478R)	<1
Pompe muscle 12	Biceps	F	30	35	GAA c.-32-13T>G; GAA c.-32-13T>G	<1
Control muscle 1	Triceps	M	—	54	—	—
Control muscle 2	Semimembranosus	M	—	40	—	—
Control muscle 3	Biceps	M	—	47	—	—
Control muscle 4	Deltoid	F	—	45	—	—
Cells						
Pompe myotubes 1	Vastus lateralis	M	39	55	GAA c.-32-13T>G; GAA c.-32-13T>G	—
Pompe myotubes 2	Vastus lateralis	M	48	62	GAA c.-32-13T>G; GAA c.1721T>C	—
Pompe myotubes 3	Biceps brachii	M	28	42	GAA c.-32-13T>G; GAA c.1396delG	—
Pompe myotubes 4 (= Pompe muscle 4)	Unknown	F	48	62	GAA c.-32-13T>G; GAA c.236_246delCCACACAGTGC	—
Control myotubes 1	Semimembranosus	F	—	72	—	—
Control myotubes 2	Pectoral	F	—	59	—	—
Control myotubes 3	Vastus lateralis	M	—	53	—	—
Control myotubes 4	Gastrocnemius caput lat.	M	—	32	—	—
Control myotubes 5	Pectoral	F	—	Unknown	—	—

F, female; M, male; LOPD, late-onset Pompe disease.

Burlingame, CA), following the manufacturer's instructions. Finally, the tissue sections were washed with distilled water, counterstained with hematoxylin for 1 minute, and mounted with Aquatex (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). A muscle biopsy from a patient with dermatomyositis was used as a positive control for the presence of BNIP3, atrogen-1, and MuRF-1. For the BNIP3 expression study, biopsies from

three patients with motor neuron disease were included to study whether denervated fibers expressed BNIP3.

For immunofluorescence, the cryosections were fixed with acetone, washed with Tris-buffered saline, and incubated in UltraCruz Blocking Reagent. Then, the tissue sections were incubated with primary and secondary antibodies, as shown in Table 2. To detect apoptosis at the

Carrasco-Rozas et al

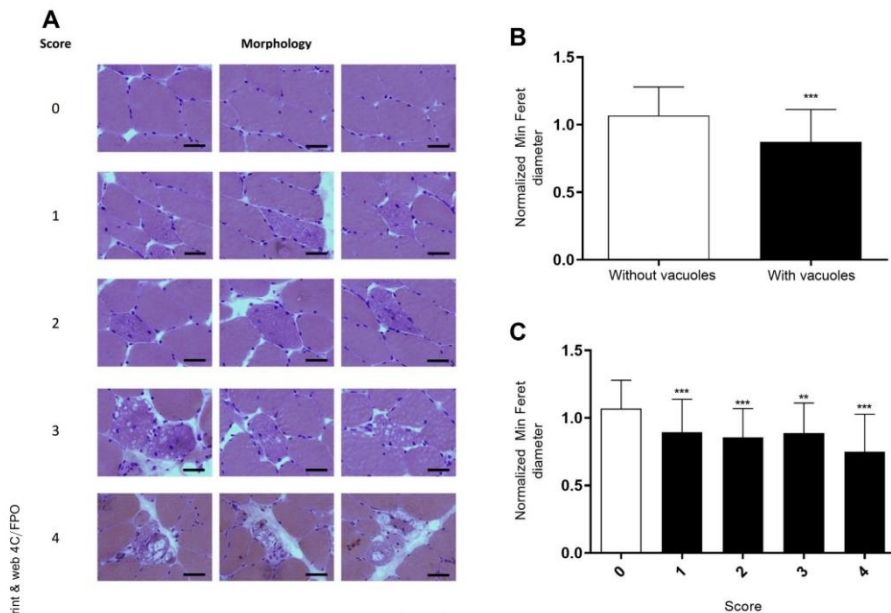


Figure 1 Muscle fiber size and presence of sarcoplasmic vacuoles in late-onset Pompe disease (LOPD). **A:** The presence of vacuoles was analyzed in muscle biopsies from six LOPD patients, and a scale was generated, classifying the fibers into five different scores, from 0 (no vacuoles at all) to 4 (sarcoplasm fully substituted by vacuoles). **B and C:** A total of >80 muscle fibers per patient were measured, and we compared the muscle fiber size depending on the presence or not of vacuoles (**B**) and depending on the score of these fibers (**C**). Data were measured using minimum Feret (Min Feret) diameter and normalized by dividing the mean of all values to each value in each patient independently. Data are expressed as means \pm SD (**B** and **C**). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Scale bars = 50 μ m (**A**).

single-cell level, the fluorometric terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling technology was used with the *In Situ* Cell Death Detection Kit (Roche, Basel, Switzerland), according to the manufacturer's instructions. Finally, the sections were mounted with Fluoromount (Sigma-Aldrich).

All the images were obtained using an Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Japan) microscope coupled to a DP72 camera or a Leica confocal microscope SP5 AOB5 (Leica) and merged using ImageJ software.

Muscle Gene Expression

Total RNA was isolated from the muscle biopsies with Rneasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions, and the RNA concentration was determined using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). cDNAs were synthesized from 0.5 μ g of total RNA using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City,

CA). Real-time PCR of cDNA was performed using TaqMan Universal PCR Master Mix and the 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). All mRNA-specific FAM-labeled primers were purchased from Applied Biosystems and detected cDNA from the following genes: *BNIP3* (Hs00969291_m1), *FBXO32/atrogin-1* (Hs01041408_m1), *TRIM63/MuRF-1* (Hs00822397_m1), and *GAPDH* (Hs99999905_m1). All of the experiments were performed in triplicate. Results were normalized to an endogenous control *GAPDH*, and relative quantification of all genes was analyzed using the comparative Ct method⁹¹⁷ with the Sequence Detection System software version 2.4 (Applied Biosystems; <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4350490>, last accessed July 16, 2021).²⁰

Isolation, Proliferation, and Differentiation of Myoblasts from Human Muscle Biopsies

For cell culture studies, primary myoblasts were isolated from human muscle biopsies that were minced and

Table 2 Primary and Secondary Antibodies Included in the Study

Target: primary antibody	Host	Dilution	Application	Reference	Manufacturer
MuRF-1/TRIM63	Mouse monoclonal	1:200 and 1:500	IHC and WB analysis	NBP2-52515	Novus Biologicals (Littleton, CO)
Fbx32/atrogin-1	Rabbit monoclonal	1:100	IHC	ab168372	Abcam (Cambridge, UK)
BNIP3	Mouse monoclonal	1:100	IHC and IF	ab10433	Abcam
Cytochrome c	Mouse monoclonal	1:250	IHC	129635	Cell Signalling
Fast myosin	Rabbit polyclonal	1:200	IF	ab91506	Abcam
p-ULK1 (in Ser317)	Rabbit polyclonal	1:100	IHC and IF	PA5-104556	Invitrogen (Waltham, MA)
p-AMPK (in Thr172)	Rabbit monoclonal	1:50	IF	2535	Cell Signalling
FUNDC1	Rabbit polyclonal	1:100	IHC and IF	NBP1-81063	Novus Biologicals
HIF-1 α	Rabbit monoclonal	1:100	IF	ab51608	Abcam
LC3B	Rabbit polyclonal	1:500	WB analysis	27755	Cell Signalling
p62	Rabbit polyclonal	1:250	IF and WB analysis	BML-PW9860-0100	Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY)
β -Actin	Mouse monoclonal	1:2000	WB analysis	A5441	Sigma-Aldrich
MyHC (MF-20)	Mouse monoclonal	1:100	IF	MAB4470	Novus Biologicals
Secondary antibody	Conjugation	Dilution	Application	Reference	Manufacturer
Biotinylated goat anti-mouse	N/A	1:200	IHC	31800	Invitrogen
Biotinylated goat anti-rabbit	N/A	1:200	IHC and IF	31820	Invitrogen
Goat anti-rabbit	Alexa 488	1:200	IF	A11008	Invitrogen
Goat anti-mouse	Alexa 594	1:200	IF	A11005	Invitrogen
Streptavidin	Alexa 594	1:200	IF	S11227	Invitrogen
Goat anti-rabbit	Alexa 594	1:200	IF	A11037	Invitrogen
Hoescht 33342	N/A	1:10,000	IF	H3570	Invitrogen
Goat anti-rabbit	IRDye 800	1:7500	WB analysis	926-32211	LI-COR Biosciences
Goat anti-mouse	IRDye 680	1:7500	WB analysis	928-68070	LI-COR Biosciences

FUNDC1, FUN14 domain-containing 1; HIF-1 α , hypoxia-inducible factor-1 α ; IF, immunofluorescence; IHC, immunohistochemistry; MuRF-1, muscle RING-finger protein-1; MyHC, myosin heavy chain; p-AMPK, phosphorylated AMP-activated protein kinase; WB, Western blot.

cultured according to the method described by Askanas and Engle.²¹ Briefly, the muscle pieces were incubated at 37°C, 5% CO₂, and 5% O₂ in a proliferation medium containing Dulbecco's modified Eagle's medium and M-199 (3:1 proportion) with 15% fetal bovine serum (all from Gibco, Thermo Fisher Scientific), 2 mmol/L L-glutamine (Lonza, Basel, Switzerland), 10 μ g/mL insulin (Sigma-Aldrich), 12.5 ng/mL basic fibroblast growth factor, 10 ng/mL epidermal growth factor (both from Peprotech, Rocky Hill, NJ), and 1% penicillin-streptomycin (Lonza). Myoblasts were isolated using anti-human CD56-phosphatidylethanolamine antibody (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany) and BD FACSAria Cell Sorter (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). To analyze the proliferation, myoblasts were seeded at 5000 cells/cm² using BdRU incorporation assay (Roche) on 3 different days (at 24, 48, and 72 hours). In addition, myoblasts were seeded at 8000 cells/cm² for Western blot analysis and on 0.15% gelatin-coated coverslips for immunofluorescence to analyze myotube formation. To induce myoblast differentiation and myotube formation, the medium was changed to low serum medium (2% of fetal bovine serum) without growth factors for 9 days.

Western Blot Analysis from Myotubes

After differentiation, myotubes were collected in pellets, and these were lysed in RIPA Buffer (Sigma-Aldrich) containing protease and phosphatase inhibitor cocktail (Roche). Total protein was quantified using the Precision Red protein assay kit (Cytoskeleton, Denver, CO). A total of 50 μ g of protein was resolved in Mini-PROTEAN TGX Precast Gels and Trans-Blot Turbo RTA Mini Nitrocellulose Transfer Kit (Bio-Rad, Hercules, CA). Membranes were blocked in casein diluted 1:1 in Tris-buffered saline and incubated with primary and secondary antibodies, as shown in Table 2. Finally, membranes were visualized using an Odyssey Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE). The amount of protein was quantified using Image Studio Lite software (LI-COR Biosciences), and protein levels were expressed relative to β -actin.

Cell Gene Expression

Gene expression assays were performed using the TaqMan Fast Advanced Cells-to-CT kit (Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's instructions after 0, 3, 6, and 9 days of differentiation. Real-time PCR was performed by

ARTICLE IN PRESS

Carrasco-Rozas et al

triplicate using the Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific) and the 7900 HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems). All mRNA-specific FAM-labeled primers were purchased from Applied Biosystems and detected cDNA from the following genes: *BNIP3* (Hs00969291_m1), *FBXO32/atrogin-1* (Hs01041408_m1), *MYO1* (Hs00159528_m1), *MYOG* (Hs01072232_m1), *MYH1* (Hs00428600_m1), and *GAPDH* (Hs99999905_m1). All experiments were performed in triplicate. Results were normalized to an endogenous control *GAPDH*, and relative quantification of all genes was analyzed using the comparative Ct method with the Sequence Detection System 2.4 software.²⁰

Myotube Immunofluorescence

After 9 days of differentiation, coverslips with myotubes were fixed with ethanol, washed with phosphate-buffered saline, and incubated with UltraCruz Blocking Reagent. Myotubes were incubated with anti-myosin heavy chain antibody and with GAM Alexa 594, as shown in Table 2. Finally, coverslips were mounted onto slides with Vectashield with DAPI (Vector Laboratories).

Images were obtained using an Olympus BX51 microscope coupled to a DP72 camera and analyzed using ImageJ software. Myotube size was evaluated by measuring the minimum Feret diameter of the myotubes from LOPD patients and healthy controls. We also analyzed the number of nuclei per myotube.

Immortalized Myoblasts and BNIP3 Transfection

The effect of BNIP3 on myotube development was studied using immortalized myoblasts from healthy controls, kindly provided by Dr. Mouly (Institut de Myologie, Paris, France).²² Myoblasts were expanded using skeletal muscle medium (Promocell, Heidelberg, Germany) and transfected with pGFP-BNIP3 plasmid (RG205087; Origene, Rockville, MD) by nucleofector. The 4D-Nucleofector Unit and the P5 Primary Cell 4D-Nucleofector Kit (Lonza) were utilized following the manufacturer's instructions. In addition, immortalized myoblasts were transfected with pmaxGFP plasmid (provided by the P5 Kit) as transfection control and to determine whether the differences in myotube formation were caused by the BNIP3 plasmid or by the transfection process. Green fluorescent protein (GFP)-positive cells were selected using BD FACSAria Cell Sorter to obtain only transfected cells. Three different groups of study were used: non-transfected, GFP-transfected, and BNIP3-transfected cells. Myoblasts were seeded on 0.15% gelatin-coated coverslips until confluence was achieved, and then the medium was changed to the above-mentioned differentiation medium for 7 to 9 days. After myotube formation, their morphology was studied by comparing myotube areas between groups. Finally, the fusion index was determined as the percentage of nuclei included in

MF-20-expressing myotubes (containing at least three nuclei) divided by the total number of nuclei.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed, and graphics were produced using GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA; <https://www.graphpad.com>, last accessed March 30, 2022). Data were expressed as means \pm SEM. Comparisons and multiple comparisons were made using the *U*-test and Tukey multiple comparisons test, respectively. The Greenhouse-Geisser test was used to compare the expression of myogenic genes between control and Pompe groups in myotube differentiation. $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Quantification of Vacuolated Fibers and Correlation to Fiber Size in Muscle Biopsies of LOPD Patients

The mean ratio of muscle fibers with sarcoplasmic vacuoles in LOPD muscle biopsies detected using hematoxylin and eosin staining was 10.06% (range, 0% to 38%) (Table 1). In 6 of the 12 patients, this ratio was $<5\%$, confirming that in LOPD vacuolization, although being a characteristic finding, this could happen in just a minority of fibers. To identify whether there was a correlation between fiber size and presence of sarcoplasmic vacuoles, a scale was established to classify fibers according to five different scores, from 0 (no vacuoles) to 4 (sarcoplasm full of vacuoles) (Figure 1A). Mean muscle fiber diameter was 12.2% smaller in fibers containing vacuoles (scores 1 to 4) than in fibers without vacuoles (score 0) ($P < 0.001$, *U*-test) (Figure 1B). Moreover, a negative correlation between the score and fibers' minimum Feret diameter was observed (Figure 1C) ($P < 0.05$, Tukey multiple comparisons test).

BNIP3 Is Expressed in Atrophic Muscle Fibers of LOPD Patients

The expression of several molecules related to fiber atrophy was studied, including atrogin-1, MuRF-1, and BNIP3, on LOPD muscle biopsies. Biopsies from healthy controls were used as negative controls, and biopsies of patients with dermatomyositis were used as positive controls, because perifascicular atrophy has been reported in these patients.^{23,24} More than 90% of the vacuolated fibers expressed BNIP3 in LOPD patients (Figure 2, A and C, and Supplemental Figure S1A). Although there were some atrophic fibers that were negative for BNIP3, most fibers expressed BNIP3. The p62, a protein involved in the process of autophagy, was expressed in BNIP3-positive muscle fibers (Supplemental Figure S1B). Fibers that were clearly positive for atrogin-1 and MuRF-1 were not observed in LOPD patients (Figure 2A). However, real-time PCR

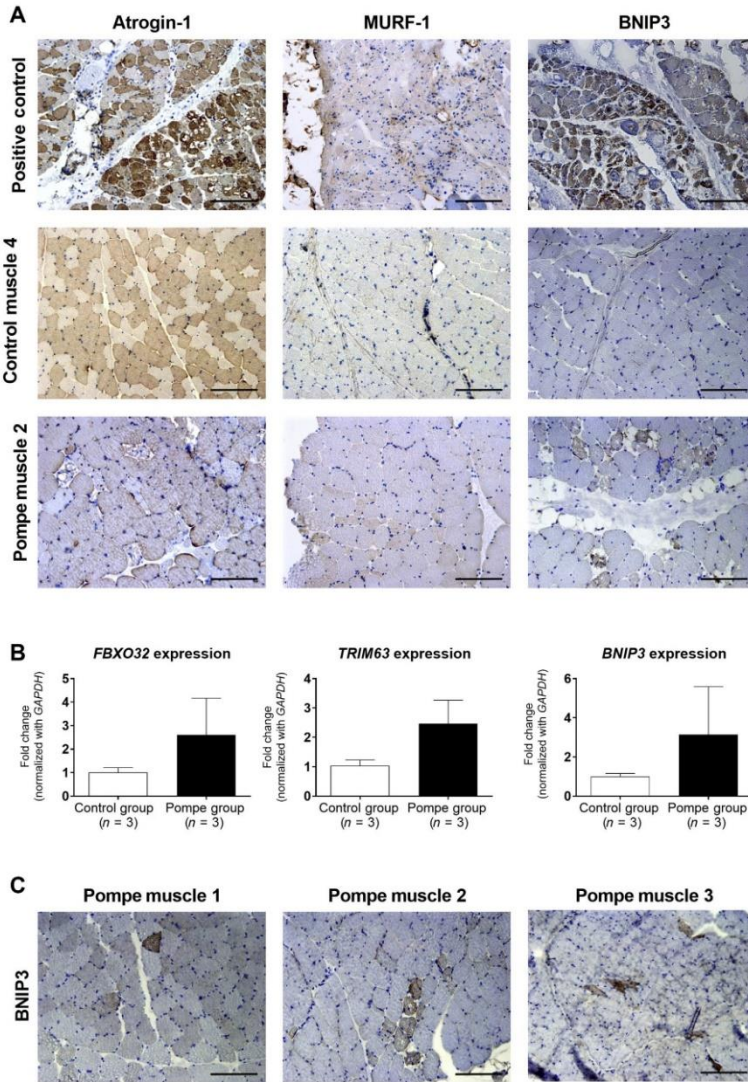


Figure 2 BNIP3 is expressed in atrophic muscle fibers of late-onset Pompe disease (LOPD) patients. **A** and **C**: Expression levels of atrogin-1, muscle RING-finger protein-1 (MuRF-1), and BNIP3 were studied in muscle biopsies from a dermatomyositis patient (positive control), healthy controls, and LOPD patients. **B**: mRNA expression of these proteins was studied in healthy controls and LOPD patients using real-time PCR. Fold changes were normalized to an endogenous control *GAPDH*, and these are expressed as means of technical triplicates. *n* = 3 controls and LOPD patients (**B**). Scale bars = 200 μ m (**A** and **C**).

print & web 4C/FPO

807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868

ARTICLE IN PRESS

Carrasco-Rozas et al

showed mRNA increased expression of *FBXO32*, *TRIM63*, and *BNIP3* in LOPD muscle biopsies compared with controls, although these differences did not reach statistical significance (Figure 2B). The expression of *BNIP3* did not depend on fiber type (Supplemental Figure S2). Moreover, as neurogenic changes have been observed in patients with Pompe disease and atrophic fibers could be denervated fibers, *BNIP3* expression was studied in muscle biopsies of patients with motor neuropathies; however, expression of

BNIP3 was not observed in atrophic fibers (Supplemental Figure S3).

BNIP3 Is Regulated by ULK1 Pathway That Is Activated in Atrophic Muscle Fibers in LOPD

To characterize the role of *BNIP3* in Pompe, the molecular pathways regulating its expression were studied (Figure 3A⁹³⁷). shows a diagram based on the study by Gao et al²⁵).

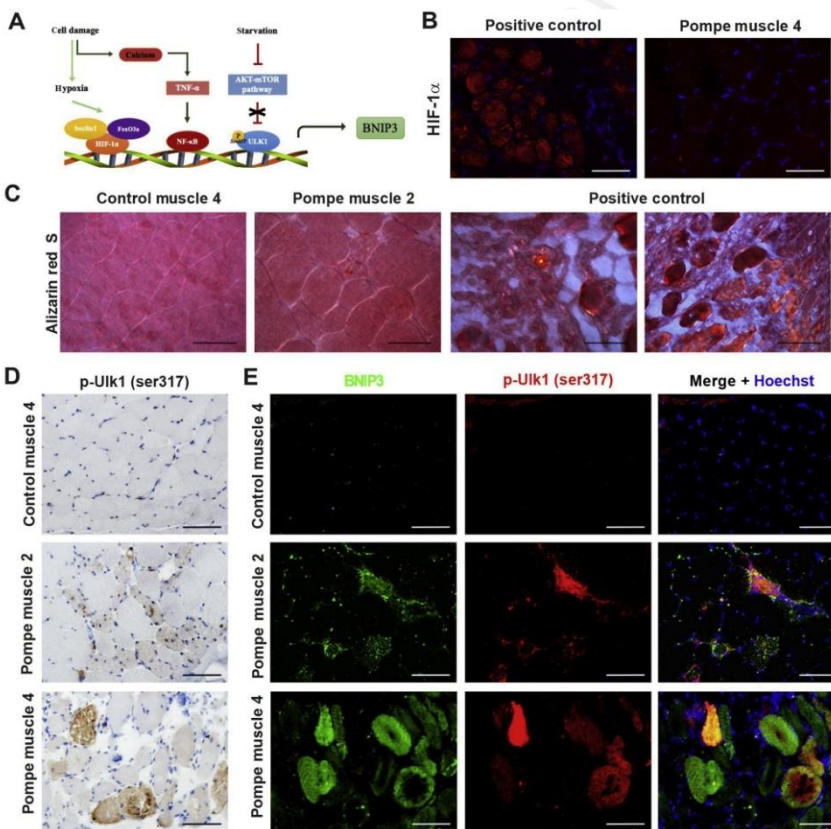


Figure 3 BNIP3 is regulated by the ULK1 pathway. **A:** The molecular pathways that regulate the expression of *BNIP3* were studied. **B:** Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α expression (red) was studied in late-onset Pompe disease (LOPD) patients using a muscle biopsy from a dermatomyositis patient as positive control. **C:** Alizarin red staining was performed to visualize the Ca²⁺ deposition in the muscle biopsies from LOPD patients. Healthy control and Duchenne muscular dystrophy patient muscles were used as negative and positive controls, respectively. **D:** Immunohistochemistry of p-ULK1 (Ser317) was performed in muscle biopsies of healthy controls and LOPD patients. **E:** Co-expression of *BNIP3* (green) and p-ULK1 Ser317 (red) was studied in these muscle biopsies using double immunofluorescence. Scale bars = 100 μ m (**B–E**).

print & web 4C/FPO

993
994
995
996
997
998
999
1000
1001
1002
1003
1004
1005
1006
1007
1008
1009
1010
1011
1012
1013
1014
1015
1016
1017
1018
1019
1020
1021
1022
1023
1024
1025
1026
1027
1028
1029
1030
1031
1032
1033
1034
1035
1036
1037
1038
1039
1040
1041
1042
1043
1044
1045
1046
1047
1048
1049
1050
1051
1052
1053
1054

Hypoxia, cell damage, and autophagy have been described to regulate the cellular expression of BNIP3. An increased expression of hypoxia-inducible factor-1 α transcription factor, which is a master regulator in tissue response to hypoxia,²⁶ was not observed (Figure 3B). Muscle membrane damage is associated with an increase in the sarcoplasmic calcium levels that activate the tumor necrosis factor- α /NF- κ B pathway, which triggers the expression of BNIP3. To study calcium accumulation, Pompe biopsies were analyzed with a polarized light microscope, and DMD biopsies were used as positive controls because of having massive cell membrane damage and accumulating calcium inside the muscle fibers. In Pompe disease, only minor calcium accumulation was observed in isolated muscle fibers (Figure 3C). BNIP3 expression is also regulated by mammalian target of rapamycin (mTOR) in response to autophagy activation. ULK1 is a key initiator of autophagy regulated by both mTOR and AMP-activated protein kinase (AMPK). Phosphorylation of ULK1 at different residues has different consequences. On the one hand, mTOR inhibits ULK through the phosphorylation of Ser555 residue. On the other hand, the inhibition of mTOR enables the interaction of ULK1 and AMPK. AMPK phosphorylates the Ser317 residue of ULK1, which induces the expression of proteins involved in autophagy. Because it has been reported that mTOR is down-regulated in Pompe disease,^{27–29} expression of AMPK and phosphorylation of Ser317 residue of

ULK1 were studied in patients. BNIP3-positive fibers co-expressed AMPK (Figure 4). Moreover, many muscle fibers in Pompe samples were positive for phosphorylated ULK1-Ser317 (Figure 3D). In addition, double immunofluorescence with BNIP3 and phosphorylated ULK1-Ser317 antibodies showed a mean of 87.37% (range, 55% to 100%) BNIP3-positive fibers co-expressing phosphorylated ULK1-Ser317 (Figure 3E and Supplemental Figure S4B).

Muscle Fiber Atrophy Is the Main Role of BNIP3 in the Muscle of LOPD Patients

BNIP3 has a prominent role in autophagy, cell atrophy, and apoptosis (Figure 5A).²⁵ As previously mentioned, it has been observed that accumulation of sarcoplasmic vacuoles is associated with muscle fiber atrophy that could be directed by the expression of BNIP3 among other pro-atrophy molecules (Figures 1 and 2). All vacuolated fibers expressed BNIP3, supporting a connection between both processes. However, BNIP3 can also induce apoptosis through mitochondrial damage. It has been reported that BNIP3 induces permeabilization of the mitochondrial membrane and release of cytochrome *c* to the cytosol, which triggers programmed cell death.^{30,31} However, up-regulation of cytochrome *c* was not found in the sarcoplasm of Pompe muscle biopsies compared with controls (Figure 5C). Moreover, the presence of DNA breakdown,

1055
1056
1057
1058
1059
1060
1061
1062
1063
1064
1065
1066
1067
1068
1069
1070
1071
1072
1073
1074
1075
1076
1077
1078
1079
1080
1081
1082
1083
1084
1085
1086
1087
1088
1089
1090
1091
1092
1093
1094
1095
1096
1097
1098
1099
1100
1101
1102
1103
1104
1105
1106
1107
1108
1109
1110
1111
1112
1113
1114
1115
1116

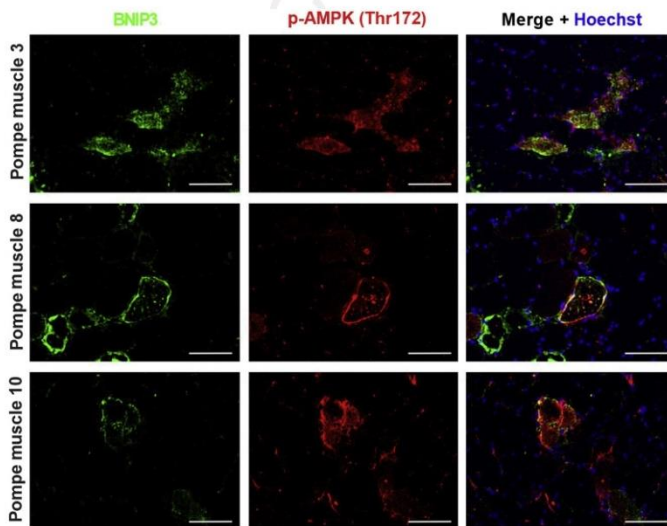


Figure 4 Co-expression of BNIP3 (green) and phosphorylated AMP-activated protein kinase (p-AMPK) Thr172 (red) was studied in muscle biopsies from late-onset Pompe disease patients. Scale bars = 100 μ m.

Carrasco-Rozas et al

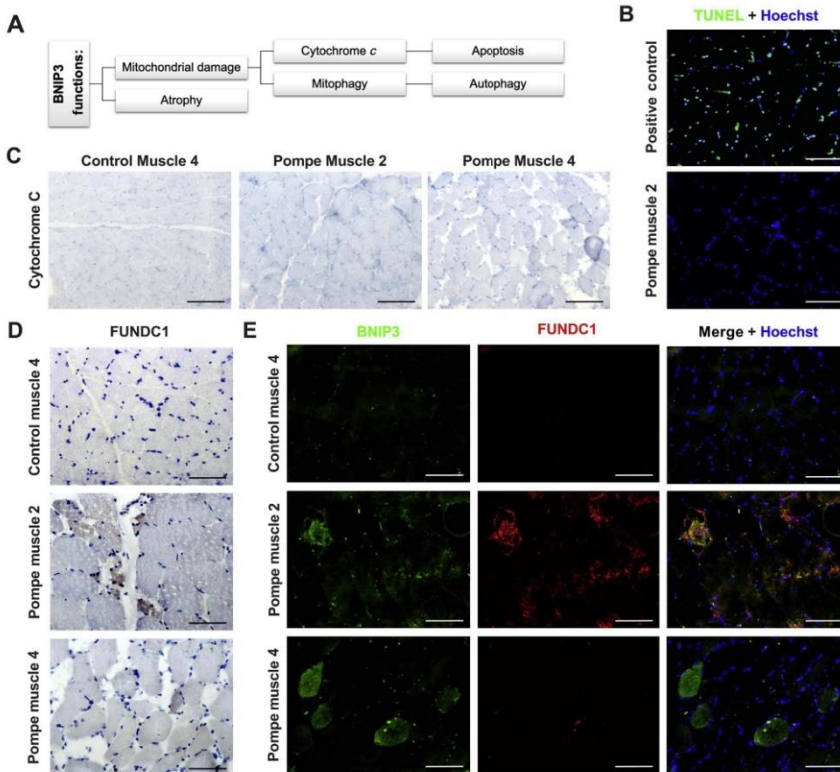


Figure 5 The main role of BNIP3 in the muscle of late-onset Pompe disease (LOPD) patients. **A:** BNIP3 functions were studied: atrophy, apoptosis, and mitophagy. **B:** Apoptosis was studied using terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) kit. **C:** Cytochrome *c* release by mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis induction was studied by immunohistochemistry. **D:** Immunohistochemistry of FUN14 domain-containing 1 (FUNDC1) was performed to study the role of mitophagy. **E:** Co-expression of BNIP3 (green) and FUNDC1 (red) was studied using double immunofluorescence. For all these studies, muscle biopsies from healthy controls and LOPD patients were used. Scale bars: 200 μ m (**B**); 100 μ m (**C–E**).

typically seen in cells undergoing apoptosis, was also checked using terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling technology. No DNA labeling was observed in the muscle biopsies of Pompe patients, confirming that apoptosis is not happening in LOPD patients (Figure 5B). As BNIP3 has been also involved in the process of mitophagy, we checked whether FUN14 domain-containing 1, a receptor of the mitochondrial outer membrane that mediates mitophagy in mammalian cells,³² was also expressed in BNIP3-positive muscle fibers. Only a few FUN14 domain-containing 1-positive fibers were identified in LOPD muscle biopsies (Figure 5D)

that co-expressed BNIP3 (Figure 5E), suggesting that an active process of mitophagy in muscle fibers expressing BNIP3 could happen occasionally. These results support the idea that the main consequence of BNIP3 overexpression in Pompe patients is muscle fiber atrophy.

Myotubes Obtained from LOPD Myoblasts Are Smaller than Healthy Controls

On the basis of the findings observed in muscle biopsies from LOPD patients, we decided to analyze whether myoblasts *in vitro* recapitulate the findings obtained *in vivo* in

1179
1180
1181
1182
1183
1184
1185
1186
1187
1188
1189
1190
1191
1192
1193
1194
1195
1196
1197
1198
1199
1200
1201
1202
1203
1204
1205
1206
1207
1208
1209
1210
1211
1212
1213
1214
1215
1216
1217
1218
1219
1220
1221
1222
1223
1224
1225
1226
1227
1228
1229
1230
1231
1232
1233
1234
1235
1236
1237
1238
1239
1240

muscle biopsies. It has been recently reported that myoblasts from Pompe patients have an intact proliferation and differentiation ability.³³ Our experiments concur with these previous results, because LOPD myoblasts displayed normal proliferation rates compared with control myoblasts (Supplemental Figure S5A). When differentiation was induced, both myoblasts from controls and from LOPD patients activated the myogenic program expressing *myogenin* (*MYOG*) and differentiated into mature myotubes expressing *MYH1* after 7 to 10 days (Supplemental Figure S5, E–G). However, the size of the myotubes obtained from LOPD myoblasts was significantly smaller than control myotubes (mean diameter from Pompe versus controls, 60.28 ± 45.55 versus $91.46 \pm 77.38 \mu\text{m}$; $P < 0.05$, *U*-test) (Figure 6, A and B). We wondered

whether these differences were related to an impaired fusion ability of myoblasts to form large multinucleated myotubes, or whether they were related to an ongoing atrophic process, mimicking what happened in muscle fibers. Differences in the number of nuclei per myotube were not observed between Pompe and controls, suggesting that myoblasts did not have a deficient fusion ability (Figure 6C). However, we observed an increase in p62 and LC3II/LC3I expression in the Pompe samples studied, suggesting that autophagy was activated in these cells, as has been previously reported (Supplemental Figure S5, B and C).^{18,34,35} Moreover, an increase in BNIP3 gene expression was observed in the Pompe myotubes, although these differences did not reach statistical significance ($P > 0.05$, *U*-test) (Figure 6, D and E). These results suggested that the process of atrophy of the

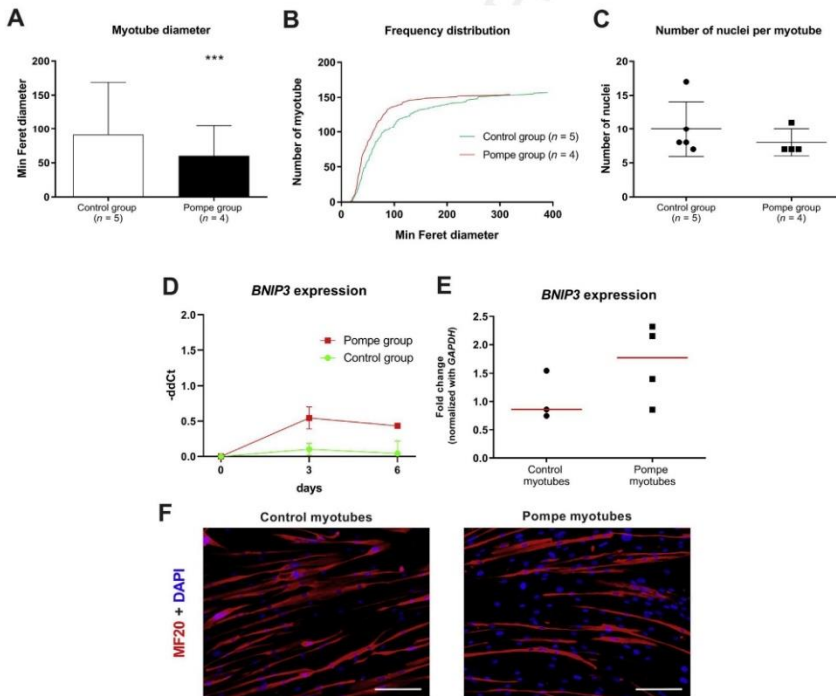


Figure 6 Late-onset Pompe disease (LOPD) myotubes are smaller than healthy controls. **A:** Myotube diameter was analyzed using minimum Feret (Min Feret) diameter in LOPD and control groups. **B:** Data were expressed in cumulative frequency distribution. **C:** Number of nuclei per myotube was analyzed in differentiated myoblasts in both groups. **D** and **E:** *BNIP3* expression was measured using real-time PCR during the differentiation process at 0, 3, and 6 days (**D**) and, finally, at 9 days in completed multinuclei myotubes (**E**). **Red lines** indicate mean values. **F:** The studies were performed after obtaining representative images of the myotube formation by immunofluorescence, visualizing myosin heavy chain (red) and nuclei (DAPI; blue). $n = 4$ for LOPD group (**A**); $n = 5$ for the control group (**A**). *** $P < 0.001$. Scale bars = $200 \mu\text{m}$ (**F**).

print & web 4C/FPO

ARTICLE IN PRESS

Carrasco-Rozas et al

1365
1366
1367
1368
1369
1370
1371
1372
1373
1374
1375
1376
1377
1378
1379
1380
1381
1382
1383
1384
1385
1386
1387
1388
1389
1390
1391
1392
1393
1394
1395
1396
1397
1398
1399
1400
1401
1402
1403
1404
1405
1406
1407
1408
1409
1410
1411
1412
1413
1414
1415
1416
1417
1418
1419
1420
1421
1422
1423
1424
1425
1426

Pompe myotubes could be induced by several factors, and not only by BNIP3 expression.

BNIP3 Transfection of Immortalized Myoblasts Induces Atrophy in Myotube Formation

To test the consequences of an isolated overexpression of BNIP3 in myotubes, immortalized control myoblasts were transfected with a *BNIP3* plasmid, and we analyzed its effect on differentiation and formation of myotubes. We also assessed the effect of transfecting myoblasts with a GFP control plasmid to rule out the results being due to the transfection process and not because of overexpression of BNIP3 (Figure 7). We found significant differences in the size of myotubes between transfected (BNIP3 and GFP plasmids) and non-transfected samples (Figure 7A).

However, the BNIP3-transfected myotubes were significantly smaller than those transfected with the control plasmid, suggesting that BNIP3 overexpression induced myotube atrophy. Significant differences were observed in the fusion index between non-transfected and transfected groups (both GFP and BNIP3), but not between GFP and BNIP3 transfected cells (Figure 7C), suggesting that the transfection process reduced the fusion index, but this was not related to the expression of BNIP3.

Discussion

Our results suggest that BNIP3 has a prominent role in autophagy and muscle fiber atrophy in LOPD patients. This process, although widely described, is not completely understood from a molecular point of view. This work expands

1427
1428
1429
1430
1431
1432
1433
1434
1435
1436
1437
1438
1439
1440
1441
1442
1443
1444
1445
1446
1447
1448
1449
1450
1451
1452
1453
1454
1455
1456
1457
1458
1459
1460
1461
1462
1463
1464
1465
1466
1467
1468
1469
1470
1471
1472
1473
1474
1475
1476
1477
1478
1479
1480
1481
1482
1483
1484
1485
1486
1487
1488

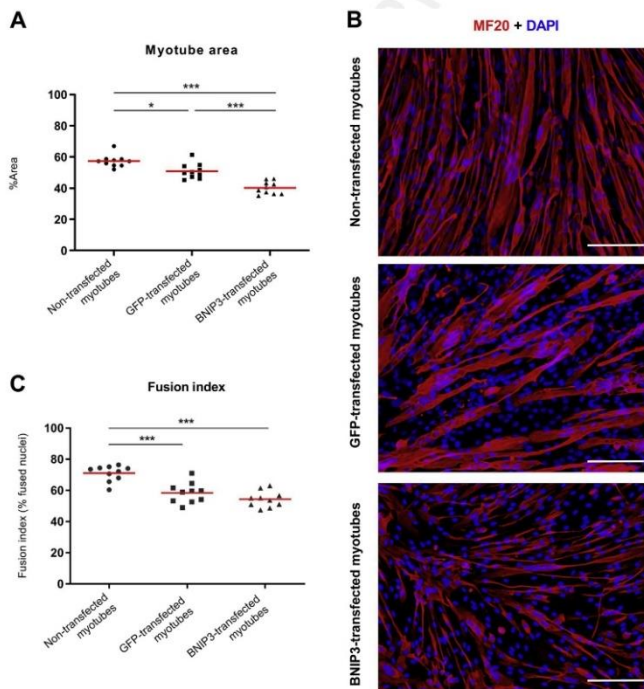


Figure 7 BNIP3 transfection induces atrophy of myotube formation. **A** and **C**: Area of mature myotubes (**A**) and fusion index of differentiated myoblasts (**C**) were analyzed after BNIP3 transfection of immortalized myoblasts. These parameters were also analyzed in myotubes from non-transfected and green fluorescent protein (GFP)–transfected myoblasts. **Red lines** indicate mean values. **B**: The studies were performed after obtaining representative images of the myotube formation by immunofluorescence, visualizing myosin heavy chain (red) and nuclei (DAPI; blue). Each point on the graphs represents the study of a field at $\times 10$. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. Scale bars = 200 μm (**B**).

1489 the knowledge of the molecular consequences of α -gluco-
 1490 sidase deficiency in Pompe disease and unveils new
 1491 potential targets for the treatment of this disorder.

1492 Pompe disease is caused by mutations in the *GAA* gene,
 1493 leading to a decreased or absent expression of the enzyme
 1494 acid α -glucosidase that metabolizes glycogen to glucose
 1495 inside lysosomes in the cells. Consequently, there is a
 1496 progressive accumulation of lysosomal glycogen that leads
 1497 to a dysfunction of the whole lysosomal function, which
 1498 eventually causes an accumulation of autophagic vacuoles
 1499 along with aged defective organelles in the sarcoplasm.³⁴
 1500 The presence of atrophic muscle fibers has been reported
 1501 in muscle biopsies of LOPD patients, and it has been
 1502 suggested that it is dependent on the accumulation of
 1503 autophagic vacuoles.¹⁶ A clear correlation between the
 1504 amount of vacuoles and muscle fiber size was observed,
 1505 which suggests that autophagic build-up triggers an intra-
 1506 cellular molecular cascade that ends up inducing fiber
 1507 atrophy.

1510 Atrophy in skeletal muscle is essentially mediated by the
 1511 activity of two highly conserved pathways, the ubiquitin-
 1512 proteasomal pathway and the autophagic/lysosomal
 1513 pathway. In the first, target proteins are conjugated to
 1514 ubiquitin moieties, and ubiquitin-tagged proteins are
 1515 degraded within the proteasome complex. This pathway is
 1516 increased in atrophying muscle because of the transcrip-
 1517 tional activation of ubiquitin and the muscle-specific ubiq-
 1518 uitin ligases, *FBXO3/atrogin1* and *TRIM63/MuRF-1*.^{36,37} A
 1519 mild increase in the transcription of *FBXO3* and *TRIM63*
 1520 was observed using real-time PCR that was limited to a low
 1521 number of muscle fibers, as shown by immunofluorescence,
 1522 which suggests that these two ligases may not be the main
 1523 drivers of muscle atrophy in LOPD. However, atrogin-1 and
 1524 MuRF-1 are not always elevated in atrophic skeletal muscle,
 1525 and other ubiquitin ligases, not studied in this article, could
 1526 play a role as well. In addition, the levels of atrogin-1 and
 1527 MuRF-1 proteins can increase for a relatively short period of
 1528 time at the beginning of the atrophy process and then return
 1529 to baseline; this could also be the reason why we have not
 1530 observed a widely increased expression of atrogin-1 and
 1531 MuRF-1.³⁸

1532 The autophagic/lysosomal pathway engulfs portions of
 1533 cytoplasm and cell organelles into vacuoles that subse-
 1534 quently fuse with lysosomes, where the content is digested
 1535 by lysosomal hydrolases.³⁷ Autophagy is a well-described
 1536 physiological pathway in skeletal muscle, as shown by the
 1537 accumulation of autophagic vacuoles in human myopathies
 1538 caused by deficiency of lysosomal proteins, such as Pompe
 1539 and Danon diseases, or by pharmacologic inhibition of
 1540 lysosomal function in chloroquine myopathy.^{39,40} The
 1541 mechanisms controlling the up-regulation of autophagy and
 1542 lysosomal genes are just starting to be known. FoxO3
 1543 transcription factor has been shown to control the tran-
 1544 scription of autophagy-related genes, such as *LC3* and
 1545 *Bnip3*, and BNIP3 appears to mediate the effect of FoxO3
 1546 on autophagy.⁴¹ We have identified the muscle fibers that

1551 express BNIP3 in LOPD muscle, although the percentage of
 1552 BNIP3-positive fibers varied notably among the patients
 1553 analyzed. However, all BNIP3-positive fibers were vacu-
 1554 olated and atrophic, which suggests a link between the
 1555 expression of this molecule, induction of autophagy, and
 1556 progressive muscle fiber atrophy.

1557 BNIP3 is a member of the Bcl-2 family of cell
 1558 death-regulating factors.⁴² The molecular pathways regu-
 1559 lating the expression of BNIP3 have been characterized in
 1560 different cell types.²⁵ Stimuli, such as cell damage, hypoxia,
 1561 oxidative stress, and starvation, can induce BNIP3 gene
 1562 expression (Figure 3A).⁴³ External cell damage in skeletal
 1563 muscle fibers is commonly associated with intracellular
 1564 accumulation of calcium, as described in DMD patients,⁴⁴ in
 1565 whom a reduction or absence of dystrophin weakens the
 1566 muscle membrane and increases its susceptibility to
 1567 contraction-induced muscle fiber damage. However, it is
 1568 doubtful whether there is active damage to the muscle
 1569 membrane in Pompe disease.⁴⁵ A large accumulation of
 1570 intracellular calcium compared with the DMD biopsies was
 1571 not found, although we observed minor punctiform intra-
 1572 cytoplasmic calcium deposits, which have been already
 1573 reported and linked to accumulation of autophagic vacuoles
 1574 in Pompe disease. Another potential factor that induces cell
 1575 damage is hypoxia, which increases the intracellular levels
 1576 of reactive oxygen species, leading to the activation
 1577 of hypoxia-inducible factor-1 α , which binds FoxO3a,
 1578 forming the complex hypoxia-inducible factor-
 1579 1 α -beclin1-phosphorylated FOXO3a, which translocates
 1580 into the nucleus and up-regulates BNIP3. However, BNIP3-
 1581 positive muscle fibers co-expressing hypoxia-inducible
 1582 factor-1 α were not observed. Finally, starvation activates
 1583 autophagy through inhibition of the AKT-mTOR pathway,
 1584 enabling the interaction of ULK1 and AMPK, which
 1585 phosphorylates the Ser317 residue of ULK1, activating the
 1586 expression of BNIP3.^{25,28} We found that 87.37% of
 1587 BNIP3-positive fibers were positive for phosphorylated
 1588 ULK1-Ser317, suggesting that in Pompe disease the
 1589 already-activated autophagy process, which is known to be
 1590 dependent on a down-regulation of the AKT-mTOR
 1591 pathway, is the main cause of BNIP3 up-regulation.^{27,46}

1592 BNIP3 expression has been linked to multiple cellular
 1593 processes, including mitochondrial damage leading to cell
 1594 death, autophagy, and cell atrophy.^{42,47,48} There is evidence
 1595 demonstrating that BNIP3 is a significant contributor to
 1596 mitochondrial damage that leads to degradation of mito-
 1597 chondria through a specific type of autophagy known as
 1598 mitophagy, as well as to cell apoptosis.⁴⁹ Once expressed,
 1599 BNIP3 dimerizes and locates on the mitochondrial mem-
 1600 brane, opening the permeability transition pore, inducing
 1601 swelling, loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$),
 1602 and release of cytochrome *c*.^{50,51} Cytochrome *c* is one of
 1603 the components of the apoptosome, which is formed in the
 1604 cytoplasm when there is mitochondrial damage triggering
 1605 apoptosis.^{52,53} However, neither increased cytochrome *c*
 1606 expression in the sarcoplasm of the muscle fibers nor

ARTICLE IN PRESS

Carrasco-Rozas et al

1613 evidence of an active apoptosis was observed. This result
 1614 suggests that BNIP3 primary function is not related to
 1615 programmed cell death in Pompe disease. However,
 1616 mitochondrial depolarization induced by BNIP3 usually
 1617 leads to sequestering of the mitochondria into autophago-
 1618 somes for organelle recycling. This process requires the
 1619 interaction of several different molecules, including FUN14
 1620 domain-containing 1, which we found expressed in only a
 1621 few muscle fibers expressing BNIP3. This suggests that an
 1622 active process of mitophagy in vacuolated fibers expressing
 1623 BNIP3 could happen, although it is not taking place in all
 1624 BNIP3-positive fibers.^{32,54,55} These results point to a
 1625 prominent role of BNIP3 in muscle fiber atrophy. In fact,
 1626 BNIP3 is one of the induced atrogens in different types of
 1627 muscle wasting and has been shown to control autophagy in
 1628 other cell systems. Moreover, BNIP3 overexpression seems
 1629 to be sufficient to induce autophagosome formation in
 1630 normal skeletal muscle, leading to muscle fiber atrophy, as
 1631 we confirmed *in vitro* by transfecting control myotubes with
 1632 BNIP3. Using primary muscle cell culture, we confirmed
 1633 that myotubes obtained from myoblasts of LOPD patients
 1634 also displayed an ongoing atrophic process, being smaller
 1635 than healthy control myotubes. We observed increased
 1636 BNIP3 expression in Pompe myotubes and an active auto-
 1637 phagic process that was evidenced by the overexpression of
 1638 p62 and LC3II/I ratio, probably leading to the reduced
 1639 myotube size. To confirm that BNIP3 expression in
 1640 myotubes induces atrophy, we transfected BNIP3 into
 1641 healthy immortalized myoblasts, which differentiated into
 1642 smaller myotubes compared with non-transfected myotubes.
 1643 Interestingly enough, in a recently published unbiased
 1644 proteomics study, BNIP3 expression was found to be
 1645 increased in the muscles of LOPD patients before and, to a
 1646 lesser extent, after starting treatment with ERT.⁵⁶ The authors
 1647 attributed the increase in BNIP3 in muscle biopsies to energy
 1648 stress, leading to activation of the p38 β -FoxO-BNIP3
 1649 signaling axis. However, this study also showed that Pompe
 1650 muscle biopsies had an increased expression of phosphory-
 1651 lated AMPK, which we also observed in our experiments,
 1652 suggesting that both pathways could contribute to BNIP3 up-
 1653 regulation. Moreover, up-regulation of BNIP3 mRNA has
 1654 been described in other limb girdle muscular dystrophies,
 1655 suggesting that BNIP3 could also be involved in the patho-
 1656 genesis of these disorders, whereas it has been shown to be
 1657 reduced in DMD and limb girdle muscular dystrophy-R9.⁵⁷⁻⁶⁰
 1658 The study of the pathogenesis of LOPD using human
 1659 samples is complicated because of the heterogeneity of
 1660 pathologic findings in the muscle samples from patients to
 1661 patients. In LOPD patients, histologic changes can affect only
 1662 a small proportion of muscle fibers, which limits the use of
 1663 Western blot analysis or real-time PCR techniques because
 1664 these technologies often miss changes that only occur in a
 1665 few fibers. We used 12 muscle biopsy LOPD patients and
 1666 observed that the mean number of fibers with vacuolization
 1667 was around 10%, with many of them having <5% of fibers
 1668 showing prominent vacuoles. To unravel the mechanisms

1675 that lead to muscle fiber atrophy in this scenario, we decided
 1676 to use conventional staining and immunofluorescence to
 1677 study the active molecular changes in single muscle fibers. In
 1678 addition, the diagnostic workup of Pompe disease has
 1679 completely changed in recent years. At present, most patients
 1680 are detected through the quantification of enzymatic expres-
 1681 sion in dried blood spot tests, which leads to direct genetic
 1682 confirmation; this considerably reduces the number of muscle
 1683 biopsies available for research studies. In conclusion, we
 1684 report compelling evidence that supports the role of BNIP3 in
 1685 the process of muscle fiber atrophy in LOPD patients. Our
 1686 data suggest that inhibition of the AKT-mTOR pathway ac-
 1687 tivates BNIP3 expression, which perpetuates autophagy and
 1688 probably induces muscle fiber atrophy. These findings sup-
 1689 port the idea that a therapeutic modulation of BNIP3 activity
 1690 could be a potential complementary new therapeutic strategy
 1691 to be tested in Pompe disease. In this sense, misoprostol, a
 1692 prostaglandin E1 analog, has recently been demonstrated to
 1693 regulate BNIP3 function in cells exposed to hypoxia-
 1694 reducing cell apoptosis.⁶¹ Our results support further
 1695 experiments to test whether misoprostol, or other similar
 1696 treatments, could also be effective in modulating BNIP3
 1697 activity in muscle fibers to reduce autophagy and atrophy in
 1698 cell or animal models of Pompe disease.

Acknowledgments

1700 We thank all the patients who provided the muscle biopsies
 1701 on which we performed all the experiments, including the
 1702 establishment of primary cultures; Dr. Vicent Mouly ^{ORCID}
 1703 (Institut de Myologie) for providing immortalized myoblasts
 1704 to perform the transfection experiments; and the people of
 1705 the Neuromuscular Disorders Unit for comments and
 1706 continuous support.

Author Contributions

1707 A.C.-R. performed the experimental part, analyzed the
 1708 results and the statistics, prepared the figures, and wrote the
 1709 article. E.F.-S., X.S.-C., P.P.-J., and N.d.L. performed
 1710 experiments, analyzed the results, and reviewed the article.
 1711 J.A.-P. visited the patients and reviewed the article. B.S. and
 1712 P.M. provided primary cells and reviewed the article. C.D.-
 1713 G., A.H.-L., C.P., and E.R. provided muscle biopsies from
 1714 patients and reviewed the article. I.I. designed and discussed
 1715 the protocol. M.O. discussed the protocol and reviewed the
 1716 article. E.G. designed the protocol, analyzed the results, and
 1717 wrote the article. J.D.-M. designed the protocol, visited the
 1718 patients, analyzed the results, wrote the article, and obtained
 1719 funding for study.

Supplemental Data

1720 Supplemental material for this article can be found at
 1721 <http://doi.org/10.1016/j.ajpath.2022.05.003>.

References

- 1737
1738
1739
1740
1741
1742
1743
1744
1745
1746
1747
1748
1749
1750
1751
1752
1753
1754
1755
1756
1757
1758
1759
1760
1761
1762
1763
1764
1765
1766
1767
1768
1769
1770
1771
1772
1773
1774
1775
1776
1777
1778
1779
1780
1781
1782
1783
1784
1785
1786
1787
1788
1789
1790
1791
1792
1793
1794
1795
1796
1797
1798
- 1799
1800
1801
1802
1803
1804
1805
1806
1807
1808
1809
1810
1811
1812
1813
1814
1815
1816
1817
1818
1819
1820
1821
1822
1823
1824
1825
1826
1827
1828
1829
1830
1831
1832
1833
1834
1835
1836
1837
1838
1839
1840
1841
1842
1843
1844
1845
1846
1847
1848
1849
1850
1851
1852
1853
1854
1855
1856
1857
1858
1859
1860
- van der Ploeg AT, Reuser AJ: Pompe's disease. *Lancet* 2008, 372: 1342–1353
- Lim JA, Li L, Raben N: Pompe disease: from pathophysiology to therapy and back again. *Front Aging Neurosci* 2014, 6:1–14
- Kohler L, Puertollano R, Raben N: Pompe disease: from basic science to therapy. *Neurotherapeutics* 2018, 15:928–942
- Kishnani PS, Gibson JB, Gambello MJ, Hillman R, Stockton DW, Kronn D, Leslie ND, Pena LDM, Tanpaiboon P, Day JW, Wang RY, Goldstein JL, An Haack K, Sparks SE, Zhao Y, Hahn SH: Clinical characteristics and genotypes in the ADVANCE baseline data set, a comprehensive cohort of US children and adolescents with Pompe disease. *Genet Med* 2019, 21:2543–2551
- Van Capelle CI, Van Der Meijden JC, Van Den Hout JMP, Jaeken J, Baethmann M, Voit T, Kroos MA, Derks TGJ, Rubio-Gozalbo ME, Willemsen MA, Lachmann RH, Mengel E, Michelakakis H, De Jongste JC, Reuser AJ, Van Der Ploeg AT: Childhood Pompe disease: clinical spectrum and genotype in 31 patients. *Orphanet J Rare Dis* 2016, 11:1–11
- Manganelli F, Ruggiero L: Clinical features of Pompe disease. *Acta Myol* 2013, 32:82–84
- Schüller A, Wenninger S, Strigl-Pill N, Schoser B: Toward deconstructing the phenotype of late-onset Pompe disease. *Am J Med Genet* 2012, 160C:80–88
- Katzin LW, Amato AA: Pompe disease: a review of the current diagnosis and treatment recommendations in the era of enzyme replacement therapy. *J Clin Neuromuscul Dis* 2008, 9:421–431
- Kupenus E, Krujishaar ME, Wens SCA, De Vries JM, Favjee MM, Van Der Meijden JC, Rizopoulos D, Brusse E, Van Doorn PA, Van Der Ploeg AT, Van Der Beek NAME: Long-term benefit of enzyme replacement therapy in Pompe disease: a 5-year prospective study. *Neurology* 2017, 89:2365–2373
- Gutschmidt K, Musumeci O, Díaz-Manera J, Chien YH, Knop KC, Wenninger S, Montagnese F, Pugliese A, Tavilla G, Alonso-Pérez J, Hwu PWL, Toscano A, Schoser B: STIG study: real-world data of long-term outcomes of adults with Pompe disease under enzyme replacement therapy with alglucosidase alfa. *J Neurol* 2021, 268: 2482–2492
- Kulesa M, Weyer-Menkoff I, Vierzug L, Komblum C, Claeys KG, Schneider I, Pöckinger U, Young P, Boentert M, Vielhaber S, Mawrin C, Bergmann M, Weis J, Ziagaki A, Stenzel W, Deschauer M, Nolte D, Hahn A, Schoser B, Schänzer A: An integrative correlation of myopathology, phenotype and genotype in late onset Pompe disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2020, 46:359–374
- Schänzer A, Kaiser AK, Mithlfield C, Kulesa M, Paulus W, von Pein H, Rohrbach M, Vierzug L, Mengel E, Marquardt T, Neubauer B, Acker T, Hahn A: Quantification of muscle pathology in infantile Pompe disease. *Neuromuscul Disord* 2017, 27:141–152
- Raben N, Ralston E, Chien YH, Baum R, Schreiner C, Hwu WL, Zaal KJM, Plotz PH: Differences in the predominance of lysosomal and autophagic pathologies between infants and adults with Pompe disease: implications for therapy. *Mol Genet Metab* 2010, 101: 324–331
- Schoser BGH, Müller-Höcker J, Horvath R, Gempel K, Pongratz D, Lochmüller H, Müller-Felber W: Adult-onset glycogen storage disease type 2: clinico-pathological phenotype revisited. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2007, 33:544–559
- Bellotti AS, Andreoli L, Ronchi D, Bresolin N, Comi GP, Corti S: Molecular approaches for the treatment of Pompe disease. *Mol Neurobiol* 2020, 57:1259–1280
- Nascimbeni AC, Fanin M, Masiero E, Angelini C, Sandri M: Impaired autophagy contributes to muscle atrophy in glycogen storage disease type II patients. *Autophagy* 2012, 8:1697–1700
- Ripolone M, Violano R, Ronchi D, Mondello S, Nascimbeni A, Colombo I, Fagioliari G, Bordonni A, Fortunato F, Lucchini V, Simona S, Filosto M, Musumeci O, Tonin P, Mongini T, Previtali S, Morandi L, Angelini C, Mora M, Sandri M, Sciacco M, Toscano A, Comi GP, Moggio M: Effects of short-to-long term enzyme replacement therapy (ERT) on skeletal muscle tissue in late onset Pompe disease (LOPD). *Int J Lab Hematol* 2016, 38:42–49
- Nascimbeni AC, Fanin M, Masiero E, Angelini C, Sandri M: The role of autophagy in the pathogenesis of glycogen storage disease type II (GSDII). *Cell Death Differ* 2012, 19:1698–1708
- Dubowitz V, A Sewry C, Oldfors A: *Muscle Biopsy: A Practical Approach*. ed 4; China: 2013
- Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 2001, 25:402–408
- Askanas V, Engel WK: A new program for investigating adult human skeletal muscle grown aneurally in tissue culture. *Neurology* 1975, 25:58–67
- Manchaoui K, Trollet C, Bigot A, Negroni E, Chaouch S, Wolff A, Kandalla PK, Marie S, Di Santo J, St Guily JL, Muntoni F, Kim J, Philippi S, Spüler S, Levy N, Blumen SC, Voit T, Wright WE, Aamiri A, Butler-Browne G, Mouty V: Immortalized pathological human myoblasts: towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders. *Skelet Muscle* 2011, 1:34
- De Luna N, Suárez-Calvet X, Lleixà C, Díaz-Manera J, Olivé M, Illa I, Gallardo E: Hypoxia triggers IFN- γ production in muscle: implications in dermatomyositis. *Sci Rep* 2017, 7:1–9
- Suárez-Calvet X, Gallardo E, Linares-Fernandez I, De Luna N, Lleixà C, Díaz-Manera J, Rojas-García R, Castellví I, Martínez MA, Grau JM, Selva-O'Callaghan A, Illa I: RIG-I expression in perifascicular myofibers is a reliable biomarker of dermatomyositis. *Arthritis Res Ther* 2017, 19:1–7
- Gao A, Jiang J, Xie F, Chen L: Bnip3 in mitophagy: novel insights and potential therapeutic target for diseases of secondary mitochondrial dysfunction. *Clin Chim Acta* 2020, 506:72–83
- Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC: Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell* 2010, 40:294–309
- Lim J, Li L, Shirihai OS, Trudeau KM, Puertollano R, Raben N: Modulation of mTOR signaling as a strategy for the treatment of Pompe disease. *EMBO Mol Med* 2017, 9:353–370
- Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL: AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 2011, 13:132–141
- Egan DF, Kim J, Shaw RJ, Guan KL: The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. *Autophagy* 2011, 7:643–644
- Quinsay MN, Lee Y, Rikka S, Sayen MR, Molkentin JD, Gottlieb RA, Gustafson AB: Bnip3 mediates permeabilization of mitochondria and release of cytochrome c via a novel mechanism. *J Mol Cell Cardiol* 2010, 48:1146–1156
- Ow YLP, Green DR, Hao Z, Mak TW: Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, 9:532–542
- Liu L, Feng D, Chen G, Chen M, Zheng Q, Song P, Ma Q, Zhu C, Wang R, Qi W, Huang L, Xue P, Li B, Wang X, Jin H, Wang J, Yang F, Liu P, Zhu Y, Sui S, Chen Q: Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 2012, 14:177–185
- Schaaf GJ, van Gestel TJM, In 't Groen SLM, de Jong B, Boomaars B, Tarallo A, Cardone M, Parenti G, van der Ploeg AT, Pijnappel WWMP: Satellite cells maintain regenerative capacity but fail to repair disease-associated muscle damage in mice with Pompe disease. *Acta Neuropathol Commun* 2018, 6:119
- Raben N, Takikita S, Pittis MG, Bembli B, Marie SKN, Roberts A, Page L, Kishnani PS, Schoser BGH, Chien YH, Ralston E, Nagaraju K, Plotz PH: Deconstructing Pompe disease by analyzing single muscle fibers: "to see a world in a grain of sand..." *Autophagy* 2007, 3:546–552
- Raben N, Schreiner C, Baum R, Takikita S, Xu S, Xie T, Myerowitz R, Komatsu M, Van Der Meulen JH, Nagaraju K,

ARTICLE IN PRESS

Carrasco-Rozas et al

- 1861 Ralston E, Plotz PH: Suppression of autophagy permits successful
1862 enzyme replacement therapy in a lysosomal storage disorder - murine
1863 Pompe disease. *Autophagy* 2010, 6:1078–1089
- 1864 36. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Clarke BA,
1865 Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Pan ZQ, Valenzuela DM,
1866 DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ: Identification of
1867 ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Am Assoc Adv
1868 Sci* 2001, 294:1704–1708
- 1869 37. Lecker SH, Goldberg AL, Mitch WE: Protein degradation by the
1870 ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc
1871 Nephrol* 2006, 17:1807–1819
- 1872 38. Wollersheim T, Woehlecke J, Krebs M, Hamati J, Lodka D, Luther-
1873 Schroeder A, Langhans C, Haas K, Radtke T, Kleber C, Spies C,
1874 Labeit S, Schuelke M, Spuler S, Spranger J, Weber-Carstens S,
1875 Fielitz J: Dynamics of myosin degradation in intensive care unit-
1876 acquired weakness during severe critical illness. *Intensive Care
1877 Med* 2014, 40:528–539
- 1878 39. Mair D, Biskup S, Kress W, Abicht A, Brück W, Zechel S, Knop KC,
1879 Koenig FB, Tey S, Nikolin S, Eggermann K, Kurth I, Ferbert A,
1880 Weis J: Differential diagnosis of vacuolar myopathies in the NGS era.
1881 *Brain Pathol* 2020, 30:877–896
- 1882 40. Malicdan MCV, Nishino I: Autophagy in lysosomal myopathies.
1883 *Brain Pathol* 2012, 22:82–88
- 1884 41. Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del
1885 Piccolo P, Burden SJ, Di Lisi R, Sandri C, Zhao J, Goldberg AL,
1886 Schiaffino S, Sandri M: FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle
1887 in vivo. *Cell Metab* 2007, 6:458–471
- 1888 42. Fordjour PA, Wang L, Gao H, Li L, Wang Y, Nyagblordzro M,
1889 Agyemang K, Fan G: Targeting BNIP3 in inflammation-mediated
1890 heart failure: a novel concept in heart failure therapy. *Heart Fail
1891 Rev* 2016, 21:489–497
- 1892 43. Tarallo A, Damiano C, Strollo S, Minopoli N, Indrieri A,
1893 Polishchuk E, Zappa F, Nusco E, Fecarotta S, Porto C, Coletta M,
1894 Iacono R, Moracci M, Polishchuk R, Medina DL, Imbimbo P,
1895 Monti DM, De Matteis MA, Parenti G: Correction of oxidative stress
1896 enhances enzyme replacement therapy in Pompe disease. *EMBO Mol
1897 Med* 2021, 13:1–21
- 1898 44. Alderton JM, Steinhardt RA: How calcium influx through calcium
1899 leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-
1900 dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *Trends Cardiovasc
1901 Med* 2000, 10:268–272
- 1902 45. Ishigaki K, Mitsuhashi S, Kuwatsuru R, Murakami T, Shishikura K,
1903 Suzuki H, Hirayama Y, Nonaka I, Osawa M: High-density areas on
1904 muscle CT in childhood-onset Pompe disease are caused by excess
1905 calcium accumulation. *Acta Neuropathol* 2010, 120:537–543
- 1906 46. Nishiyama Y, Shimada Y, Yokoi T, Kobayashi H, Higuchi T, Eto Y,
1907 Ida H, Ohashi T: Akt inactivation induces endoplasmic reticulum
1908 stress-independent autophagy in fibroblasts from patients with Pompe
1909 disease. *Mol Genet Metab* 2012, 107:490–495
- 1910 47. Zhang J, Ney PA: Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy,
1911 and mitophagy. *Cell Death Differ* 2009, 16:939–946
- 1912 48. Kubasiak LA, Hernandez OM, Bishopric NH, Webster KA: Hypoxia
1913 and acidosis activate cardiac myocyte death through the Bcl-2 family
1914 protein BNIP3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99:12825–12830
- 1915 49. Ney PA: Mitochondrial autophagy: origins, significance, and role of
1916 BNIP3 and NIX. *Biochim Biophys Acta* 2015, 1853:2775–2783
- 1917 50. O'Neill KL, Huang K, Zhang J, Chen Y, Luo X: Inactivation of
1918 pro-survival Bcl-2 proteins activates Bax/Bak through the outer
1919 mitochondrial membrane. *Genes Dev* 2016, 30:973–988
- 1920 51. Ray R, Chen G, Vande Velde C, Cizeau J, Park JH, Reed JC, Daniel
1921 Gietz R, Greenberg AH: BNIP3 heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-X(L)
1922 and induces cell death independent of a Bcl-2 homology 3 (BH3)
1923 domain at both mitochondrial and nonmitochondrial sites. *J Biol
1924 Chem* 2000, 275:1439–1448
- 1925 52. Dorstyn L, Akey CW, Kumar S: New insights into apoptosome
1926 structure and function. *Cell Death Differ* 2018, 25:1194–1208
- 1927 53. Shakeri R, Kheirollahi A, Davoodi J, Apaf-1: regulation and function
1928 in cell death. *Biochimie* 2017, 135:111–125
- 1929 54. Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Yee ST, Jin HB, Wesley JB,
1930 Gonzalez FJ, Semenza GL: Mitochondrial autophagy is an HIF-1-
1931 dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem*
1932 2008, 283:10892–10903
- 1933 55. Elmore SP, Qian T, Grissom SF, Lemasters JJ: The mitochondrial
1934 permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes. *FASEB
1935 J* 2001, 15:2286–2287
- 1936 56. Moriggi M, Capitanio D, Torretta E, Barbacini P, Bragato C,
1937 Sartori P, Moggio M, Maggi L, Mora M, Gelfi C: Muscle proteomic
1938 profile before and after enzyme replacement therapy in late-onset
1939 Pompe disease. *Int J Mol Sci* 2021, 22:1–20
- 1940 57. Fanin M, Nascimbeni AC, Angelini C: Muscle atrophy in limb girdle
1941 muscular dystrophy 2A: a morphometric and molecular study. *Neu-
1942 ropathol Appl Neurobiol* 2013, 39:762–771
- 1943 58. Fanin M, Nascimbeni AC, Angelini C: Muscle atrophy, ubiquitin-
1944 proteasome, and autophagic pathways in dysferlinopathy. *Muscle
1945 Nerve* 2014, 50:340–347
- 1946 59. De Palma C, Morisi F, Cheli S, Pambianco S, Cappello V, Vezzoli M,
1947 Rovere-Querini P, Moggio M, Ripolone M, Francolini M, Sandri M,
1948 Clementi E: Autophagy as a new therapeutic target in Duchenne
1949 muscular dystrophy. *Cell Death Dis* 2012, 3:e418
- 1950 60. Franeckova V, Storjord HI, Leivseth G, Nilsen Ø: Protein homeo-
1951 stasis in LGMDR9 (LGMD2I) – the role of ubiquitin–proteasome
1952 and autophagy–lysosomal system. *Neuropathol Appl Neurobiol*
1953 2021, 47:519–531
- 1954 61. Field JT, Martens MD, Mughal W, Hai Y, Chapman D,
1955 Hatch GM, Ivancio TL, Diehl-Jones W, Gordon JW: Misoprostol
1956 regulates Bnip3 repression and alternative splicing to control
1957 cellular calcium homeostasis during hypoxic stress. *Cell Death
1958 Discov* 2018, 4:98
- 1959 1923
1960 1924
1961 1925
1962 1926
1963 1927
1964 1928
1965 1929
1966 1930
1967 1931
1968 1932
1969 1933
1970 1934
1971 1935
1972 1936
1973 1937
1974 1938
1975 1939
1976 1940
1977 1941
1978 1942
1979 1943
1980 1944
1981 1945
1982 1946
1983 1947
1984 1948

16